

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Disruptores heterocíclicos de la dimerización de la TryR de
"L. infantum" como herramientas terapéuticas innovadoras**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Revuelto Pérez

Directoras

**Sonsoles Velázquez Díaz
María José Camarasa Ríos**

Madrid

© Alejandro Revuelto Pérez, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

TESIS DOCTORAL

**Disruptores heterocíclicos de la dimerización
de la TryR de *L. infantum* como herramientas
terapéuticas innovadoras**

Alejandro Revuelto Pérez

Directoras: Dra. Sonsoles Velázquez Díaz

Dra. María José Camarasa Ríos

FACULTAD DE FARMACIA



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____,
estudiante en el Programa de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20____

Fdo.: _____

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

ÍNDICE

ABREVIATURAS EMPLEADAS	i
RESUMEN	iv
SUMMARY	xi
I.1. INTRODUCCIÓN	1
I.1.1. Ciclo vital de <i>Leishmania</i>	2
I.1.2. Tratamiento actual de la enfermedad	3
I.1.3. Metabolismo redox de los tripanosomátidos y de los mamíferos.....	5
I.1.4. La tripanotión reductasa (TryR) como diana terapéutica	7
I.1.5. Inhibidores de la tripanotión reductasa.....	11
I.2. ANTECEDENTES.....	19
I.2.1. Moduladores de IPPs: disruptores de la dimerización de <i>Li</i> -TryR.....	19
I.2.1.1. Análisis de la interfaz de dimerización de <i>Li</i> -TryR: identificación de <i>hot spots</i> ..	20
I.2.1.2. Péptido lineal prototipo P1 . Prueba de concepto.....	21
I.2.1.3. Peptidomiméticos como disruptores de la dimerización de <i>Li</i> -TryR.....	23
I.2.2. Miméticos estructurales no peptídicos de hélice α : <i>Proteomiméticos</i>	28
I.3. ESTRUCTURA DEL TRABAJO Y OBJETIVOS GENERALES	34
I.4. BIBLIOGRAFÍA.....	36
CAPÍTULO 1: PROTEOMIMÉTICOS BASADOS EN EL ESQUELETO DE 5-6-5 IMIDAZOL-FENIL-TIAZOL.....	47
1.1. Diseño de los proteomiméticos.....	47
1.1.1. Elección de los residuos clave del péptido P1 para la actividad	47
1.1.2. Elección del esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol	48
1.2. Síntesis del proteomimético objetivo 1.2	49
1.2.1. Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática (SN_{Ar})	50
1.2.2. Acoplamiento C-N tipo Ullmann	54
1.2.3. Síntesis de Hantzsch de tiazoles sustituidos	58
1.3. Modificaciones estructurales en la posición R₃	61
1.4. Evaluación biológica	63

1.4.1. Ensayos enzimáticos.....	63
1.4.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad.....	67
1.4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares.....	68
1.5. Conclusiones.....	69
1.6. Bibliografía.....	71

CAPÍTULO 2: NUEVOS DISRUPTORES DE LA DIMERIZACIÓN DE *Li*-TryR BASADOS EN UN ESQUELETO DE TRIAZOL-FENIL-TIAZOL77

2.1. Síntesis de triazol-fenil-tiazoles (Serie I)	79
2.1.1. Síntesis de una primera serie de compuestos de la Serie I	79
2.1.2. Síntesis de nuevos derivados para estudios de SAR	87
2.2. Síntesis de sales de triazolio-fenil-tiazol (Serie II)	94
2.2.1. Estudio de la reacción de alquilación.....	94
2.2.2. Síntesis de derivados de la Serie II modificados en R₁ , R₂ , R₃ y R₄	98
2.3. Evaluación biológica	101
2.3.1. Ensayos enzimáticos frente a <i>Li</i> -TryR.....	101
2.3.2. Ensayos enzimáticos frente a glutatión reductasa humana (hGR)	106
2.3.3. Estudio de la eficiencia del ligando y análisis de las propiedades <i>druglike</i>	107
2.3.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad.....	116
2.3.5. Estudios para la determinación del mecanismo de acción en el parásito	120
2.4. Conclusiones.....	125
2.5. ANEXO: Estudio de las propiedades fluorescentes de los compuestos	127
2.5.1. Caracterización fotofísica de los compuestos de referencia de cada tipo de esqueleto.....	128
2.5.2. Diseño, síntesis y caracterización fotofísica de nuevos derivados de triazol con sustituyentes conjugados en el esqueleto central.....	130
2.5.3. Evaluación biológica de los nuevos fluoróforos.....	136
2.5.4. Estudio de la capacidad de penetración celular en promastigotes de <i>L. infantum</i>	138
2.6. Bibliografía.....	140

CAPÍTULO 3: MECANISMO DE INHIBICIÓN DE *Li*-TryR Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS CON LA ENZIMA147

3.1. Mecanismo de inhibición de <i>Li</i> -TryR por parte de los compuestos	147
3.2. Estudio de los complejos cristalográficos de los compuestos con <i>Li</i> -TryR mediante difracción de rayos X	151
3.3. Estudio de la interacción con <i>Li</i> -TryR de los disruptores de dimerización mediante herramientas computacionales.....	157
3.3.1. Búsqueda de posibles sitios de unión a <i>Li</i> -TryR mediante FTMap para los disruptores de dimerización	157
3.3.2. Análisis de la accesibilidad a la cavidad central mediante CAVER	159
3.3.3. Propuesta de un modelo de interacción de los disruptores de dimerización en la cavidad central interfacial.....	160
3.3.4. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados disustituidos en el anillo de tiazol.....	163
3.3.5. Diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos simétricos	168
3.4. Conclusiones.....	179
3.5. Bibliografía.....	181

CONCLUSIONES GENERALES 185

E1. CHEMISTRY PROCEDURES 191

E1.1. General methods	191
E1.2. Chromatographic methods	191
E1.3. Structural elucidation and characterization methods	192
E1.4. Commercially available products.....	193
E1.5. Synthesis and characterization of α -bromoketone intermediates.....	196
E1.5.1. Synthesis of non-commercially available α,β -unsaturated methylketones	196
E1.5.2. Synthesis of non-commercially available disubstituted ketones and diketones	198
E1.5.3. Bromination of methylketones intermediates	200
E1.6. Synthesis and characterization of imidazole-phenyl-thiazoles (Chapter - 1)	206
E1.7. Synthesis and characterization of triazole-phenyl-thiazoles (Chapter - 2).....	219
E1.8. Synthesis and characterization of triazole structures of Chapter - 3	271

E2. SOLUBILITY AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES CHARACTERIZATION	296
E2.1. Solubility measurements	296
E2.1.1. Absorption measurements.	296
E2.2. Emission measurements.	296
E2.2.1. Fluorescence spectra.	296
E2.2.2. Excitation spectra.	297
E3. COMPUTATIONAL METHODS	297
E3.1. FTMap software and CAVER software	297
E3.2. Docking studies	298
E3.3. Molecular dynamic simulations (MD simulations)	298
E4. BIOLOGICAL EVALUATION	299
E4.1. <i>Li</i> -TryR and hGR oxidoreductase activity assay.....	299
E4.2. Dimer quantitation assay	299
E4.3. <i>In vitro</i> leishmanicidal activity assay	300
E4.3.1. Estimation of EC ₅₀ values against promastigotes.....	300
E4.3.2. Estimation of EC ₅₀ values against amastigotes.	300
E4.3.3. Estimation of CC ₅₀ values against monocytes (THP-1) and hepatocytes (HepG2) and THP-1 differentiated monocytes.....	301
E4.3.4. Estimation of EC ₅₀ values against infected macrophages.	301
E4.3.5. Evaluation of compound's influence on superoxide radical production.	302
E4.3.6. Evaluation of compound's influence on parasite thiol levels.....	302
E5. X-RAY CRISTALLOGRAPHY	303
E6. BIBLIOGRAPHY.....	304

ABREVIATURAS EMPLEADAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en Guidelines for Authors (*J. Org. Chem.* **2008**, 73). La expresión de algunos términos en inglés se ha empleado con la intención conservar, en la medida de lo posible, el significado original con el que se emplean en las áreas especializadas, reservando los términos en castellano para aquellos conceptos y técnicas cuya expresión en este lenguaje no altere su significado original. A pesar de estar recogidos a continuación, se especifica nuevamente su significado la primera vez que aparecen en el texto.

• Generales

ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
BSO	Butionina sulfoximina
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonil
BTCP	1-(1-(benzo(<i>b</i>)tien-2-il)ciclohexil)piperidina
Cbz/Z	Carbobenciloxi
CCTLC	Cromatografía circular centrífuga en capa fina (<i>Centrifugal Thin-Layer Chromatography</i>)
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
CI ₅₀ act	Concentración inhibitoria 50 para inhibir al 50% la actividad enzimática
CI ₅₀ dim	Concentración inhibitoria 50 para reducir el porcentaje de dímero al 50%
CMFDA	Diacetato de 5-clorometilfluoresceina (<i>5-Chloromethylfluorescein diacetate</i>)
CPPs	Péptidos de penetración celular (<i>Cell-Penetrating Peptides</i>)
CT	Banda de transferencia de carga (<i>Charge Transfer</i>)
DHE	Dihidroetidio (<i>Dihydroethidium</i>)
DM	Dinámica Molecular
DTNB	Ácido ditionitrobenzoico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FAD	Flavín adenina dinucleótido
FDA	Administración estadounidense de alimentación y medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (<i>Förster Resonance Energy Transfer</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GR	Glutación reductasa
GS	Estado fundamental (<i>Ground State</i>)
GSH	Glutación reducido
GSH1	γ-Glutamilcisteína sintetasa
GSH2	Glutación sintetasa
GSSG	Glutación oxidado

CuAAC	Cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre (<i>Copper (I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>)
ER	Enlaces rotables
HA	Átomos distintos de hidrógeno (<i>Heavy Atoms</i>)
hGR	Glutación reductasa humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HTS	Cribado de alto rendimiento (<i>High Throughput Screening</i>)
IPPs	Interacciones proteína-proteína
IS	Índice de selectividad
LC	Leishmaniasis cutánea
LDPK	Leishmaniasis dérmica post-kala azar
LE	Estado localmente excitado (<i>Locally Excited</i>)
<i>Li</i> -TryR	Tripanotión reductasa de <i>Leishmania infantum</i>
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MBS	Sitio de unión de mepacrina (<i>Mepacrine Binding Site</i>)
NADP ⁺	Forma oxidada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nle	Norleucina
NME	Nuevas entidades moleculares (<i>New Molecular Entities</i>)
ODC	Ornitina descarboxilasa
OLED	Diodos orgánicos emisores de luz (<i>Organic Light-Emitting Diode</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SAR	Relaciones estructura-actividad (<i>Structure-Activity Relationship</i>)
SASA	Superficie accesible al disolvente (<i>Solvent Accessible Surface Area</i>)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SN _{Ar}	Reacción de sustitución nucleófila aromática
SpS	Espermidina sintetasa
<i>Tb</i> -TryR	Tripanotión reductasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
<i>Tc</i> -TryR	Tripanotión reductasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TI	Transcriptasa inversa
TIM	Triosafosfato isomerasa
TNB	Ácido tionitrobenzoico
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TryR	Tripanotión reductasa
TryS	Tripanotión sintetasa
T[SH] ₂	Tripanotión reducido

TS2	Tripanotión oxidado
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

- **Reactivos y disolventes**

NBS	N-bromosuccinimida
CDI	1,1-Carbonildiimidazol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
KHMDS	Bis-trimetilsililamida de potasio
<i>p</i> -TsOH	ácido <i>p</i> -toluensulfónico
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano

RESUMEN

Introducción y antecedentes

La leishmaniasis es una enfermedad tropical olvidada considerada como una de las más antiguas de la humanidad, a pesar de que el parásito de *Leishmania* causante de la patología, no fue descubierto hasta 1901 por William Leishman y Charles Donovan. Dicha especie catalogada como *Leishmania donovani*, es junto con la *Leishmania infantum* la responsable de la forma más agresiva de la enfermedad denominada leishmaniasis visceral o kala azar. La leishmaniasis representa tras la malaria, la segunda causa parasitaria de muerte con más de 50.000 defunciones al año. La enfermedad es endémica en más de 97 países. El arsenal de fármacos disponibles para el tratamiento de la *leishmaniasis* es escaso, obsoleto y presenta problemas de toxicidad y resistencias lo que justifica la urgente necesidad de desarrollar terapias novedosas más eficaces.

Dentro de las estrategias de diseño de nuevos fármacos empleadas habitualmente, el diseño racional basado en la diana representa una alternativa prometedora al reposicionamiento de fármacos o al cribado fenotípico más utilizado en el campo de los antiparasitarios. Dentro de las enzimas implicadas en el metabolismo redox de tioles, la tripanotión/tripantotona reductasa (TryR) es una de las dianas validadas más atractivas en la búsqueda de nuevos anti-tripanosomátidos, ya que se trata de una enzima esencial para la supervivencia del parásito y es exclusiva del mismo al no estar presente en los mamíferos hospedadores.

A pesar de la amplia variedad de inhibidores de TryR descritos en la literatura que actúan en el centro activo de la enzima, no se han conseguido resultados satisfactorios *in vivo*. Con el fin de desarrollar inhibidores novedosos que pudieran ser de utilidad en el tratamiento de la leishmaniasis, nuestro grupo de investigación inició hace unos años una nueva línea de investigación encaminada a explorar un nuevo mecanismo de inhibición basado en la disrupción del proceso de dimerización de la enzima, puesto que la forma catalíticamente activa de la enzima es un homodímero.

Para ello se desarrollaron una serie de inhibidores peptídicos de interacciones proteína-proteína (IPPs), derivados de una hélice alfa de la interfaz de dimerización de la TryR del parásito *Leishmania infantum* (Li-TryR), que contiene los residuos previamente identificados y validados como *hot spots* para el proceso de dimerización.

Inicialmente se diseñaron péptidos lineales que resultaron ser inhibidores potentes tanto de la actividad oxidorreductasa como de la dimerización de la enzima, los cuales nos permitieron realizar la prueba de concepto del nuevo mecanismo de inhibición propuesto. A partir de estos resultados, se sintetizaron a continuación una serie de peptidomiméticos (péptidos cíclicos y foldámeros) con el fin de obtener compuestos con mejor estabilidad proteolítica y permeabilidad celular que los péptidos lineales. A pesar de obtenerse inhibidores

enzimáticos potentes y más estables, estos peptidomiméticos, al igual que los péptidos lineales, no mostraron actividad leishmanicida en ensayos en cultivo celular. El posterior marcaje con sondas fluorescentes permitió comprobar que dicha falta de actividad se debía a la incapacidad de los derivados peptídicos de atravesar la membrana celular del parásito. Finalmente, la conjugación de estos inhibidores con péptidos de penetración celular (CPPs) dio lugar a compuestos con actividad leishmanicida potente, aunque con bajos índices de selectividad, lo que invitaba a seguir evolucionando hacia entidades químicas de naturaleza no peptídica con mejores propiedades farmacocinéticas y menor citotoxicidad.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos disruptores no peptídicos de la dimerización de *Li-TryR*, basados en moléculas heterocíclicas pequeñas con una farmacocinética más favorable que los péptidos y peptidomiméticos precursores, con el fin último de obtener agentes leishmanicidas potentes, selectivos y con mejores propiedades como fármaco (*druglike*).

El estudio del modo de interacción de los compuestos con la enzima así como el diseño de nuevos derivados se ha llevado a cabo mediante la combinación de técnicas de cristalografía de R-X y técnicas computacionales en colaboración con el Prof. Juan Hermoso (IQFR-CSIC) y el Prof. Federico Gago (UAH). La evaluación biológica, en ensayos enzimáticos de actividad y dimerización frente a *Li-TryR* y los ensayos en cultivo celular frente a parásitos extra- e intracelulares, se ha realizado en colaboración con el grupo del Prof. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá (UAH), que asimismo, ha estudiado tanto el mecanismo de inhibición de los compuestos más potentes frente a la enzima, como el mecanismo de acción de los compuestos que podría ser el responsable de la muerte de los parásitos en cultivo celular.

Resultados y discusión

La presente tesis doctoral se ha estructurado en tres capítulos cuyos resultados se resumen a continuación:

Capítulo 1: Para el diseño de compuestos no peptídicos, en este capítulo se ha utilizado una estrategia de búsqueda de miméticos estructurales de hélice α (proteomiméticos) basada en un esqueleto o *scaffold* heterocíclico descrito de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol. Dicho esqueleto, que reemplaza el esqueleto carbonado del péptido prototipo, se ha "decorado" con sustituyentes **R₁**, **R₂** y **R₃** que mimetizan las cadenas laterales de los residuos clave de **Lys**, **Gln** e **Ile** en las posiciones **i**, **i+3** e **i+7** del péptido para la interacción con la proteína. La adaptación de la ruta sintética descrita para la introducción de estas cadenas laterales ha exigido un esfuerzo de optimización sintético importante especialmente en las reacciones de SN_{Ar} , acoplamiento C-N tipo Ullmann y síntesis de α -bromocetonas necesarias para la síntesis de Hantzsch de tiazoles. Finalmente, se ha obtenido una pequeña quimioteca de derivados de

imidazol-fenil-tiazol modificados en la posición **R₃** con distintos grupos hidrófobos alifáticos y aromáticos.

- En cuanto a los resultados de la evaluación biológica en ensayos enzimáticos, únicamente los derivados de imidazol **1.22** y **1.23**, sustituidos con grupos aromáticos naftilo y bifenilo en **R₃**, han resultado ser inhibidores potentes de la actividad oxidoreductasa de la *Li*-TryR comportándose como disruptores moderados de la dimerización. En cultivo celular de parásitos extracelulares (promastigotes y amastigotes) y en modelos intracelulares de macrófagos infectados con amastigotes, estos compuestos han mostrado actividad leishmanicida potente en el rango micromolar, aunque se han obtenido bajos índices de selectividad debido a la toxicidad observada en líneas celulares humanas de hepatocitos HepG2.

Capítulo 2: Aplicando una estrategia de *scaffold hopping* a partir de los proteomiméticos de imidazol-fenil-tiazol anteriores se han diseñado dos series de compuestos estructuralmente novedosas: una primera serie de compuestos basada en un esqueleto de 5-6-5 triazol-fenil-tiazol (**Serie I**) y una segunda serie de sales de triazolio (**Serie II**) obtenidas por alquilación del triazol. Los buenos resultados de actividad biológica observados para los primeros compuestos sintetizados respecto a los imidazoles predecesores han motivado la síntesis de nuevos compuestos modificados principalmente en las posiciones **R₁**, **R₂**, **R₃** con el fin de realizar estudios de relación estructura-actividad (SAR).

- Los ensayos enzimáticos de inhibición de la actividad y de la dimerización de *Li*-TryR con las dos series de compuestos han demostrado la importancia para la actividad de la presencia de un grupo amonio en **R₁**, un grupo imidazolidinona en **R₂** y grupos aromáticos voluminosos en **R₃** unidos a través de un espaciador etilénico al triazol. En general, los compuestos de triazol de la **Serie I** se han comportado como disruptores de la dimerización más potentes que las sales de triazolio de la **Serie II**, para los que, por el contrario, se han obtenido los valores más bajos de Cl_{50} en el ensayo de actividad. Destacan los inhibidores **2.27** y **2.28** de la **Serie I** con una Cl_{50} act = 5.9 μ M e Cl_{50} dim = 5.1 μ M, similares al péptido prototipo. Dentro de la **Serie II**, destaca la sal de triazolio **2.81** con un grupo bifenilo capaz de conjugar ambas actividades, lo que ha convertido a estos compuestos en los primeros disruptores no peptídicos potentes de la dimerización de *Li*-TryR.
- Ensayos de dimerización frente a la enzima homóloga humana hGR indican que los compuestos desdimerizan en menor medida la enzima humana observándose valores de Cl_{50} dim entre 3 y 4 veces superiores frente a la enzima humana vs la enzima del parásito.
- En cuanto a los ensayos en cultivo celular frente a parásitos extra- e intracelulares, en general los compuestos de ambas series han mostrado actividad leishmanicida potente en el rango micromolar bajo, lo que demuestra al igual que con los imidazoles predecesores

y a diferencia de los péptidos originales, exhibiendo una buena permeabilidad celular. Se han observado diferencias importantes en cuanto a la citotoxicidad de los compuestos de ambas series, observándose en general una mayor citotoxicidad para los triazoles de la **Serie I** en comparación con las sales de triazolol de la **Serie II**. Así, para algunos compuestos (**2.36** y **2.85**) se han alcanzado índices de selectividad muy superiores a los obtenidos para los imidazoles y péptidos predecesores.

- Estudios del mecanismo de acción de los compuestos más representativos revelan que la TryR podría ser una de las dianas intracelulares involucrada en la muerte del parásito.
- Adicionalmente, se ha realizado un estudio de las propiedades fluorescentes de los compuestos de imidazol, triazol y sales de triazolol **1.32**, **2.26** y **2.79**, observándose una emisión en el azul para los dos primeros derivados, y en el verde para la sal de triazolol prototipo **2.79**, con rendimientos cuánticos moderados en todos los casos. Se han diseñado nuevos compuestos con sustituyentes aromáticos directamente conjugados a las dos posiciones del tiazol, en los que se han conseguido desplazar las bandas de emisión desde los 498 nm hasta los 547 nm en el caso de las sales de triazolol. Es interesante resaltar que la introducción de un grupo Ph en la posición 5- del tiazol, hasta ahora no explorada en los estudios de SAR, ha dado lugar a compuestos muy potentes en ensayos enzimáticos y en cultivo celular lo que abre posibilidades nuevas para una optimización posterior de los ligandos.

Capítulo 3: Se ha estudiado el mecanismo de inactivación de *Li*-TryR por parte de los compuestos más representativos del **Capítulo 2**, determinándose que los compuestos se comportan como inhibidores irreversibles de la enzima (tiempo-dependientes) debido a que inducen la precipitación de la proteína. Los compuestos son muy potentes con valores de K_i de 0.5 y 1.8 μM para las sales de triazolol más solubles **2.80** y **2.81**, muy inferiores al del inhibidor de referencia mepacrina ($K_i = 19 \mu\text{M}$) y similares al del péptido prototipo ($K_i = 0.5 \mu\text{M}$). Sin embargo, a diferencia del péptido prototipo que actúa mediante un mecanismo de inhibición no competitivo, los nuevos compuestos muestran un cierto carácter competitivo lo que sugiere un sitio de interacción diferente con la enzima.

- Ha sido posible obtener la estructura cristalina de complejos de algunas sales de triazolol (**Serie II**), que no mostraban efecto desdimerizador de *Li*-TryR, observándose que los ligandos interaccionan en el sitio de unión de mepacrina en el centro activo de la enzima. Se han diseñado ligandos más potentes en base a esta estructura cristalina que apoyan la hipótesis de diseño.
- Para los triazoles (**Serie I**) disruptores de dimerización, portadores de residuos hidrófobos aromáticos voluminosos (para los que ha sido imposible la cocrystalización debido a la precipitación de la proteína) se ha propuesto mediante técnicas computacionales un modelo de interacción en una cavidad hidrófoba central, situada en la interfaz de

dimerización de la *Li*-TryR, que representa una región diferente a la de la hélice α mimetizada por los péptidos y peptidomiméticos antecesores de este trabajo. Esta cavidad sería accesible desde el centro activo a través de un túnel que conecta ambas regiones. El modo de unión propuesto permite racionalizar los estudios de SAR .

- En base a este nuevo modelo se han diseñado ligandos simétricos muy novedosos, que ocupan simultáneamente los dos monómeros de la enzima, y que han dado lugar a la obtención de disruptores de la dimerización más potentes que el inhibidor monomérico de referencia, resultados que apoyarían el modo de unión propuesto.
- Aunque la cavidad central interfacial de la TryR de parásitos no ha sido explorada hasta el momento para la unión de ligandos, sí se ha cristalizado algún complejo con ligandos (ej. safranina) en una cavidad central similar en la enzima homóloga humana hGR. Los estudios de competición del ligando simétrico prototipo con safranina han reforzado el modelo de interacción propuesto en la cavidad interfacial.

Conclusiones

A lo largo de esta tesis doctoral se han explorado distintas aproximaciones para el diseño de disruptores no peptídicos del proceso de dimerización de la TryR de *L. infantum* con mejores propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad que los péptidos y peptidomiméticos desarrollados anteriormente en el grupo de investigación. El uso de una estrategia de proteomiméticos (imidazol-fenil-tiazoles del **Capítulo 1**) seguida de *scaffold hopping* ha permitido la obtención de dos series de compuestos de triazol-fenil-tiazol (**Serie I**) y de sales de triazolio (**Serie II**), estructuralmente novedosas, que han resultado ser inhibidores muy potentes de la enzima, tanto en el ensayo de actividad (especialmente los compuestos de la **Serie II**), como de la dimerización de la enzima (fundamentalmente la **Serie I** de triazoles) con valores similares a los del péptido original. Se han propuesto distintos sitios de interacción de los compuestos con la enzima. Así, se han cristalizado complejos de algunas sales de triazolio (sin efecto desdimerizador) con la *Li*-TryR donde los ligandos interaccionan en el centro activo. Para los desdimerizadores más potentes (**Serie I**) se ha propuesto un modelo de interacción en una cavidad central hidrófoba de la interfaz de dimerización inexplorada hasta el momento para la unión de ligandos. Se han diseñado inhibidores simétricos muy potentes que apoyan el modo de unión y pueden ser considerados herramientas químicas útiles para profundizar en el estudio y función de esta cavidad central interfacial.

Finalmente, los compuestos de ambas series han mostrado actividad leishmanicida potente, en el rango micromolar bajo (similar a la de los conjugados del péptido prototipo con péptidos de penetración celular), lo que indica una excelente permeabilidad celular. Cabe destacar, en general, una menor citotoxicidad de algunas sales de triazolio que ha conducido a IS muy superiores a los de los péptidos prototipo e imidazoles del **Capítulo 1**. Todos estos resultados junto a las propiedades fluorescentes y la buena solubilidad en agua mostrada por

los compuestos, así como el cumplimiento, en general, de los criterios Lipinski y extensiones adicionales para una buena absorción y permeabilidad tras administración oral, convierten a algunas sales de triazolio (2.81, 2.85) en candidatos interesantes y prometedores para ensayos *in vivo* en ratones.

SUMMARY

Introduction and background

Leishmaniasis is a neglected tropical disease considered one of the oldest in humanity, although the *Leishmania* parasite, which causes the pathology, was not discovered until 1901 by William Leishman and Charles Donovan. This species, classified as *Leishmania donovani*, is together with *Leishmania infantum* responsible for the most aggressive form of the disease known as visceral leishmaniasis or kala azar. Leishmaniasis represents, after malaria, the second most deadly parasitic disease causing more than 50,000 deaths per year.

The disease is endemic in more than 97 countries. The arsenal of drugs available for the treatment of leishmaniasis is scarce, obsolete and with numerous side effects, toxicity and resistance problems for patients. All this justifies the urgent need to develop novel and more effective therapies.

Within the strategies commonly used for the design of new drugs, the rational design based on the target represents a promising alternative to the repositioning of drugs or to the phenotypic screening used in the field of antiparasitics. Among the enzymes involved in the redox metabolism of thiols, trypanothion / tripanothione reductase (TryR) is one of the most attractive validated targets in the search for new anti-trypanosomatides, since it is an essential enzyme for the survival of parasite and it is exclusive of the parasite since it is not present in mammalian hosts.

Despite the wide variety of TryR inhibitors described in the literature that act in the active site of the enzyme, satisfactory results have not been achieved *in vivo*. In order to develop novel inhibitors that could be useful in the treatment of Leishmaniasis, our research group has initiated a new line of research aimed at exploring a new mechanism of inhibition based on the disruption of the dimerization process of the enzyme, since the catalytically active form of the enzyme is a homodimer.

To this aim, in recent years, our group has developed a series of peptide inhibitors of protein-protein interactions (IPPs), derived from an alpha helix of the dimerization interface of the TryR of the parasite *Leishmania infantum* (Li-TryR), which contains the residues previously identified and validated as hot spots for the dimerization process.

Initially, linear peptides were designed, which proved to be potent inhibitors of both the oxidoreductase activity and the dimerization of the enzyme, which allowed us to carry out the proof of concept of the proposed new mechanism of inhibition. From these results, a series of peptidomimetics (cyclic peptides and foldamers) were synthesized in order to obtain compounds with better proteolytic stability and cellular permeability than the linear peptides. Despite obtaining potent and more stable enzyme inhibitors, these peptidomimetics, like the linear peptides, did not show leishmanicidal activity in cell culture assays. The subsequent

labeling with fluorescent probes allowed to verify that this lack of activity was due to the inability of the peptide derivatives to cross the cellular membrane of the parasite. Finally, the conjugation of these inhibitors with cell-penetrating peptides (CPPs) gave rise to compounds with potent leishmanicidal activity, although with low selectivity indexes, which invited to continue evolving towards chemical entities of non-peptidic nature with better pharmacokinetic properties and lower toxicity.

Objectives

The main objective of this doctoral thesis has been the design, synthesis and biological evaluation of new nonpeptide *Li*-TryR dimerization disruptors based on small heterocyclic molecules with a more favorable pharmacokinetics than peptides and peptidomimetic ancestors, with the final aim of obtain powerful and selective leishmanicidal agents with better properties as a drug (druglike). The study of the mode of interaction of the compounds with the enzyme as well as the design of new derivatives has been carried out through the combination of techniques of X-ray crystallography and computational techniques in collaboration with Prof. Juan Hermoso (IQFR-CSIC) and Prof. Federico Gago (UAH).

The biological evaluation, in enzymatic assays of activity and dimerization against *Li*-TryR and cell culture assays against extra- and intracellular parasites, has been carried out in collaboration with the group of Prof. Antonio Jiménez of the University of Alcalá (UAH), which has also studied both the mechanism of inhibition of the most potent compounds against the enzyme, and the mechanism of action of the compounds that could be responsible for the death of parasites in cell culture.

Results and Discussion

The present doctoral thesis is structured in three chapters whose results are summarized below:

Chapter 1: For the design of non-peptidic compounds, in this chapter an α -helical structural mimetics (proteomimetics) strategy based on a described scaffold of 5-6-5 imidazole-phenyl-thiazole. This scaffold, which replaces the carbon skeleton of the prototype peptide, has been "decorated" with substituents **R₁**, **R₂** and **R₃** that mimic the side chains of the key residues of **Lys**, **Gln** and **Ile** in positions **i**, **i + 3** and **i + 7** of the peptide for the interaction with the protein. The adaptation of the synthetic route described for the introduction of these side chains has required an important synthetic optimization effort especially in the reactions of S_NAr , C-N coupling Ullmann-type and synthesis of α -bromoketones necessary for Hantzsch synthesis of thiazoles. Finally, a small library of modified imidazole-phenyl-thiazole derivatives at the **R₃** position with different hydrophobic aliphatic and aromatic groups has been obtained.

- Regarding the results of the biological evaluation in enzymatic assays, only the imidazole derivatives **1.22** and **1.23**, substituted with naphthyl and biphenyl aromatic groups at R₃, were potent inhibitors of the oxidoreductase activity of *Li*-TryR behaving as moderate disruptors of dimerization. In cell culture of extracellular parasites (promastigotes and amastigotes) and in intracellular models of macrophages infected with amastigotes, these compounds have shown potent leishmanicidal activity in the micromolar range, although low selectivity indices have been obtained due to the toxicity observed in human cell lines of HepG2 hepatocytes.

Chapter 2: From the previous imidazole-phenyl-thiazole proteomimetics and by applying a strategy of scaffold hoping, two series of structurally novel compounds have been designed, a first series of compounds based on a 5-6-5 triazole-phenyl thiazole skeleton (**Series I**) and a second series of triazolium salts (**Series II**) obtained by alkylation of the triazole. The preparation of the target compounds has been carried out from a common intermediate used in the synthetic route of the imidazoles of the previous chapter. The good biological activity results observed for the first synthesized compounds with respect to the predecessor imidazoles have led to the synthesis of new modified compounds mainly at positions **R₁**, **R₂**, **R₃** in order to establish structure-activity relationship studies (SAR).

- Enzymatic assays inhibition of activity and dimerization of *Li*-TryR with the two series of compounds have demonstrated the importance for the activity of the presence of an ammonium group at **R₁**, a imidazolidinone moiety at **R₂** and bulky aromatic groups at **R₃** linked through an ethylenic spacer to the thiazole. In general, the triazole compounds of **Series I** have behaved as more powerful dimerization disruptors than the triazolium salts of **Series II**, for which, the lowest IC₅₀ values have been obtained in the activity assay. The inhibitors **2.27** and **2.28** of the **Series I** stand out with an IC_{50 act} = 5.9 μM and IC_{50 dim} = 5.1 μM similar to the prototype peptide. It also highlights the triazolium salt **2.81** with a biphenyl group capable of combining both activities, which has turned these compounds into the first potent non-peptide disruptors of *Li*-TryR dimerization.
- Dimerization assays against the homologous human enzyme hGR indicate that the compounds de-dimerize to a lesser extent the human enzyme, observing values of IC_{50 dim} between 3 and 4 times higher than the human enzyme vs the enzyme of the parasite.
- Regarding the cell culture assays, against extra- and intracellular parasites, in general, the compounds of both series have shown potent leishmanicidal activity in the low micromolar range what demonstrates, as with the predecessor imidazoles and unlike the original peptides, good cellular permeability. Significant differences have been observed regarding the cytotoxicity of the compounds of both series, with a greater cytotoxicity being generally observed for the triazoles of the **Series I** in comparison with the triazolium salts of the **Series II**. Thus, for some compounds (**2.36** and **2.85**) much higher selectivity index with respect to those obtained for imidazoles and predecessor peptides have been observed.

- Studies of the mechanism of action of the most representative compounds reveal that TryR could be one of the intracellular targets responsible for the observed leishmanicidal activity.
- Additionally, a study of the fluorescent properties of the compounds of imidazole, triazole and triazolium salts **1.32**, **2.26** and **2.79** has been carried out being observed a blue emission for the formers and green emission for the latter, with moderate quantum yields in all cases. New compounds have been designed with aromatic substituents directly conjugated to the two positions of the thiazole in which they have been achieved emission wavelengths even of 547 nm. It is interesting to note that the introduction of a Ph group at position 5 of thiazole, so far explored in SAR studies, has led to very potent compounds in enzymatic and cell culture assays which opens new possibilities for a further optimization of the ligands.

Chapter 3: The mechanism of inactivation of *Li*-TryR by the most representative compounds of **Chapter 2** has been studied, determining that the compounds behave as irreversible inhibitors (time-dependent) of the enzyme because they induce its precipitation. The compounds are very potent with K_i values of 0.5 and 1.8 μM for the more soluble triazolium salts **2.80** and **2.81**, much lower values than the reference inhibitor mepacrine ($K_i = 19 \mu\text{M}$) and similar to that of the prototype peptide ($K_i = 0.5 \mu\text{M}$). However, unlike the prototype peptide acting through a non-competitive inhibition mechanism, the new compounds show a certain competitive character, suggesting a different interaction site with the enzyme.

- It has been possible to obtain the crystal structure of complexes of some of the triazolium salts (**Series II**), which did not show *Li*-TryR desdimerizing effect, observing that the ligands interact at the mepacrine binding site in the active site of the enzyme. More potent ligands have been designed based on this crystalline structure that supports the design hypothesis.
- For triazoles dimerization disruptors (**Series I**) bearing bulky aromatic hydrophobic residues (for which co-crystallization has been impossible due to the precipitation of the protein during the tests) an interaction model has been proposed by computational techniques, at a central hydrophobic cavity, located at the dimerization interface of *Li*-TryR, which represents an interfacial region different from that of the original α helix mimicked by the peptides and peptidomimetic predecessors of this work. This cavity would be accessible from the active center through a tunnel that connects both regions. The proposed mode of union allows to rationalize SAR studies.
- Based on this new model, novel symmetric ligands have been designed, which simultaneously occupy the two monomers of the enzyme, which has led to the obtaining of more powerful dimerization disruptors than the monomeric reference inhibitor. These results would support the proposed mode of interaction.

- Although the central interfacial cavity of the parasites TryR has been so far unexplored for the binding of ligands, some complexes with ligands (eg safranin) has been crystallized in a similar central cavity in the human homologous enzyme hGR. The competition studies of the prototype symmetric ligand with safranin have reinforced the interaction model proposed in the interfacial cavity.

Conclusions

Throughout this doctoral thesis, different approaches for the design of non-peptide disruptors of the dimerization process of TryR of *L. infantum* with better pharmacokinetic and bioavailability properties than the peptides and peptidomimetics developed previously in the research group have been explored. The use of a proteomimetics strategy (imidazole-phenyl-thiazoles in **Chapter 1**) followed by scaffold hoping has allowed the obtaining of two structurally novel series of triazole-phenyl-thiazole compounds (**Series I**) and triazolium salts (**Series II**). These compounds turned out to be very powerful inhibitors of the enzyme, both in the enzyme activity assay (especially the **Series II** compounds), and in the dimerization assay (mainly the **Series I** triazoles) with similar values to those to the original peptide. Different sites of interaction of the compounds with the enzyme have been proposed. Thus, complexes of some triazolium salts (without desdimerizing effect) have been crystallized with *Li*-TryR where the ligands interact in the active center. For the most powerful de-dimerizers (**Series I**) an interaction model has been proposed in a central hydrophobic cavity of the dimerization interface, so far unexplored for the binding of ligands. Very powerful symmetrical inhibitors have been designed and synthesized that support the proposed binding mode and can be considered useful chemical tools to deepen into the study and function of this central interfacial cavity.

Finally, the compounds from both series have shown potent leishmanicidal activity, in the low micromolar range (similar to those of the prototype peptide conjugates with cell penetration peptides), thus indicating an excellent cellular permeability. It should be noted, in general, a lower cytotoxicity of some triazolium salts that has led to SI much higher than those of previous peptides and imidazoles of **Chapter 1**. All these results together with the fluorescent properties and the good solubility in water shown by all the compounds, as well as the in general compliance with the Lipinski criteria (and additional extensions) for a good absorption and permeability for oral administration, make of some triazolium salts (**2.81, 2.85**) interesting and promising candidates for *in vivo* assays in mice.

I.1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo del género *Leishmania*, perteneciente a la familia de los Tripanosomátidos, que se transmite a través de la picadura de vectores dípteros del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. A pesar de ser considerada como una enfermedad tropical olvidada, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 2017 que la enfermedad es endémica en 97 países donde sólo en ese año se comunicaron más de 1 millón de nuevos casos. Aproximadamente 1 billón de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad y sumarse así a los más de 12 millones de infectados actualmente.¹

Atendiendo a su epidemiología, la leishmaniasis se puede presentar de tres formas diferentes: cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) o *kala azar*, siendo esta última la variante más agresiva de la enfermedad ya que puede resultar mortal, si no se trata, por afectar a órganos vitales como el hígado o el bazo.² El 90% de los casos de LV se concentran en países en vías de desarrollo como Sudán, Etiopía, Somalia, Bangladesh, India o Brasil (**Figura I1**),³ donde se estima que aproximadamente 20.000 personas fallecen anualmente a causa de esta enfermedad, lo que da una idea del problema de salud pública que supone.

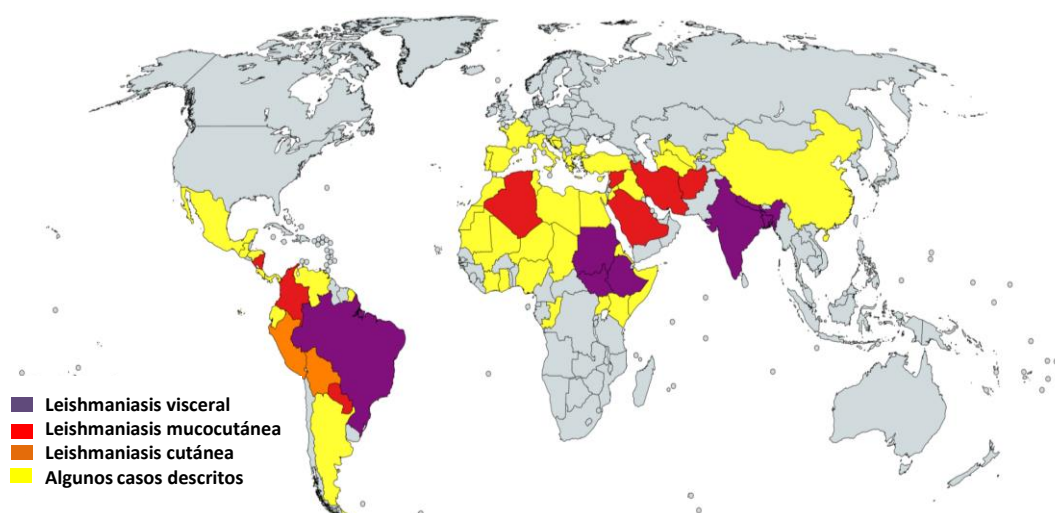


Figura I1. Mapa mundial de países afectados por Leishmaniasis según datos de la OMS.¹

Además, a la problemática intrínseca de esta enfermedad hay que añadir los casos cada vez más frecuentes de co-infección *Leishmania* y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Al tratarse de enfermedades que afectan al sistema inmunológico, la sinergia que presentan entre ellas resulta letal puesto que una infección concomitante por VIH incrementa entre 100 y 2300 veces las posibilidades de desarrollar LV, mientras que ésta última puede acelerar la replicación y evolución de la infección por VIH hacia el SIDA.⁴

De las más de 20 especies descritas de *Leishmania* que afectan a humanos, *L. infantum* en la que se centra este trabajo, destaca por ser una de la especies predominantes en el viejo

mundo y en concreto una de las más relevantes en España, siendo además junto con la *L. donovani*, una de las especies responsable de la LV.⁵

I.1.1. Ciclo vital de *Leishmania*

El ciclo vital de las especies de *Leishmania* es relativamente sencillo e involucra un estadio en el vector flebótomo (subfamilia de *Psychodidae*) y otro en el huésped mamífero (**Figura I2**).⁶

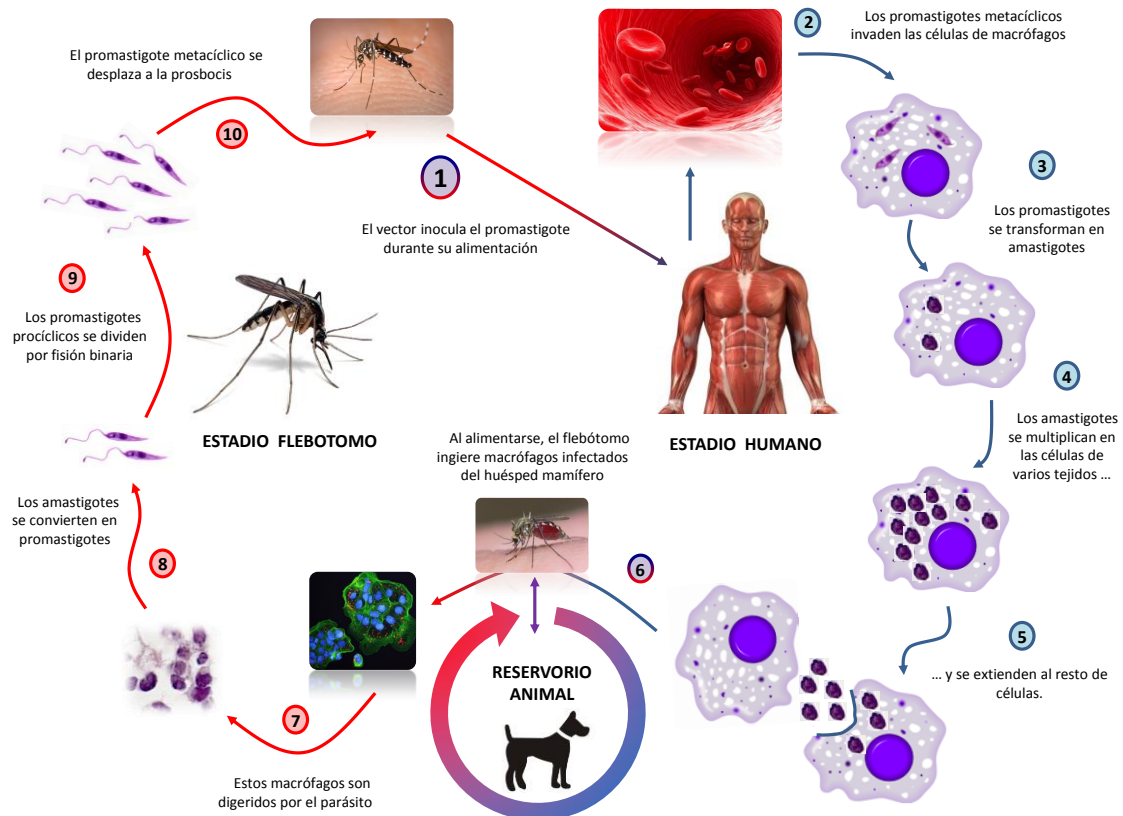


Figura I2. Ciclo vital de *Leishmania*.

El ciclo comienza cuando un díptero hembra infectado transmite los parásitos durante su alimentación al huésped vertebrado (*etapa 1*). Una vez en el flujo sanguíneo, los promastigotes son rápidamente fagocitados por neutrófilos y macrófagos como respuesta inmune primaria del mamífero (*etapa 2*). En el interior de estas células fagocíticas, los parásitos se transforman en amastigotes (*etapa 3*) en un proceso inducido por la exposición a la temperatura corporal (32 - 37 °C) y al pH ácido (4.5 - 5.5) del interior de las células del sistema inmunitario. Tras la diferenciación, los amastigotes se multiplican mediante división simple en el interior de una vacuola del macrófago denominada fagolisosoma (*etapa 4*), hasta que provocan el colapso de la célula y se liberan al flujo sanguíneo desde donde infectan nuevas células inmunes (*etapa 5*). Mientras la infección se mantiene localizada en la región dermal, el resultado es una lesión de tipo cutánea (LC) que puede evolucionar posteriormente a la forma mucocutánea (LMC) más grave. No obstante, determinadas especies como *L.*

infantum en el Mediterráneo y América o *L. donovani* en África y Asia, pueden dar lugar a una parasitemia más agresiva (LV) que genera lesiones en órganos vitales como el hígado o el bazo. Volviendo de nuevo al ciclo, cuando una hembra no infectada de flebótomo pica al huésped mamífero (*etapa 6*) ingiere los amastigotes presentes en las células fagocíticas de la piel (*etapa 7*), los cuales se diferencian a su forma flagelada promastigote en el interior del vector y se multiplican rápidamente en el plazo de 4 a 14 días (*etapas 8 y 9*). Finalmente y tras varias diferenciaciones menores en el propio flebótomo, los parásitos migran desde el intestino hasta las glándulas salivares donde se transforman en promastigotes metacíclicos (*etapa 10*), y aguardan hasta un nuevo proceso de alimentación del vector.⁷

Cabe destacar además que aproximadamente 13 especies de *Leishmania* entre las que se encuentra *L. infantum*, tienen un carácter zoonótico, lo que significa que determinadas especies animales como los perros pueden actuar de reservorio intermedio estableciéndose así un eslabón de unión entre las regiones más salvajes y los ambientes domésticos, lo que contribuye a la persistencia de esta enfermedad y acrecienta las posibilidades de contraerla.⁶

Por último con respecto a las características patológicas más destacables de la leishmaniasis, es necesario mencionar que las distintas especies causantes de la enfermedad poseen mecanismos de virulencia únicos que les permiten perdurar en los fagocitos del mamífero hospedador por largos periodos de tiempo, convirtiéndose en enfermedades de carácter crónico incluso después de la aplicación del tratamiento. Un ejemplo representativo de esta persistencia lo representa la leishmaniasis dérmica post-*kala azar* (LDPK),⁸ que puede aparecer meses o incluso años después de un tratamiento en pacientes que han sufrido y superado LV.

I.1.2. Tratamiento actual de la enfermedad

A pesar de que la leishmaniasis fue descrita ya en 1903 por Leishman y Donovan,⁹ aún no existe ninguna vacuna disponible en el mercado debido especialmente a la complejidad del ciclo vital del parásito.¹⁰ Este hecho hace que la quimioterapia sea la principal estrategia empleada en el tratamiento de esta enfermedad.

El arsenal de fármacos del que se dispone en la actualidad¹¹ (**Figura I3**), se podría resumir en los siguientes grupos:

- **Antimoniales pentavalentes (Sb^V) (I1 e I2):**

Descubiertos en 1945, los antimoniales pentavalentes representan la primera línea de actuación para el tratamiento de la enfermedad.⁴ Se comercializan principalmente como estibogluconato de sodio (Pentostam™) (I1) y antimoniato de meglumina (Glucantime™) (I2), y precisan de una administración diaria, por vía parenteral, durante al menos 3 semanas. En cuanto a su modo de acción, estos profármacos requieren de la reducción intracelular a su forma trivalente (Sb^{III}) para ser activos, y su mecanismo de acción parece estar relacionado con

la alteración del sistema redox del parásito y con la biosíntesis de macromoléculas. En los últimos años, la aparición de resistencias relacionadas con el empleo de estos fármacos se ha evidenciado en países como Nepal, donde aproximadamente el 30% de los pacientes tratados con antimoniales pentavalentes no han mostrado respuesta al tratamiento.¹¹

- **Anfotericina B y su forma liposomal (L-AmB) (I3):**

El deoxicolato de anfotericina B (Fungizone™) es un polieno empleado inicialmente como antifúngico, que se comenzó a utilizar para el tratamiento de la leishmaniasis¹² en los años 60 tras la aparición de resistencias a Sb^V. Su forma liposomal L-Amb (AmBisome™) aunque posee una menor toxicidad, requiere igualmente de administración mediante infusión intravenosa diaria. El mecanismo de acción de este fármaco parece involucrar alteraciones de la membrana del parásito como consecuencia de su unión a ergosterol, y a pesar de su alta eficacia como agente antiparasitario, presenta graves problemas de toxicidad que limitan su empleo.

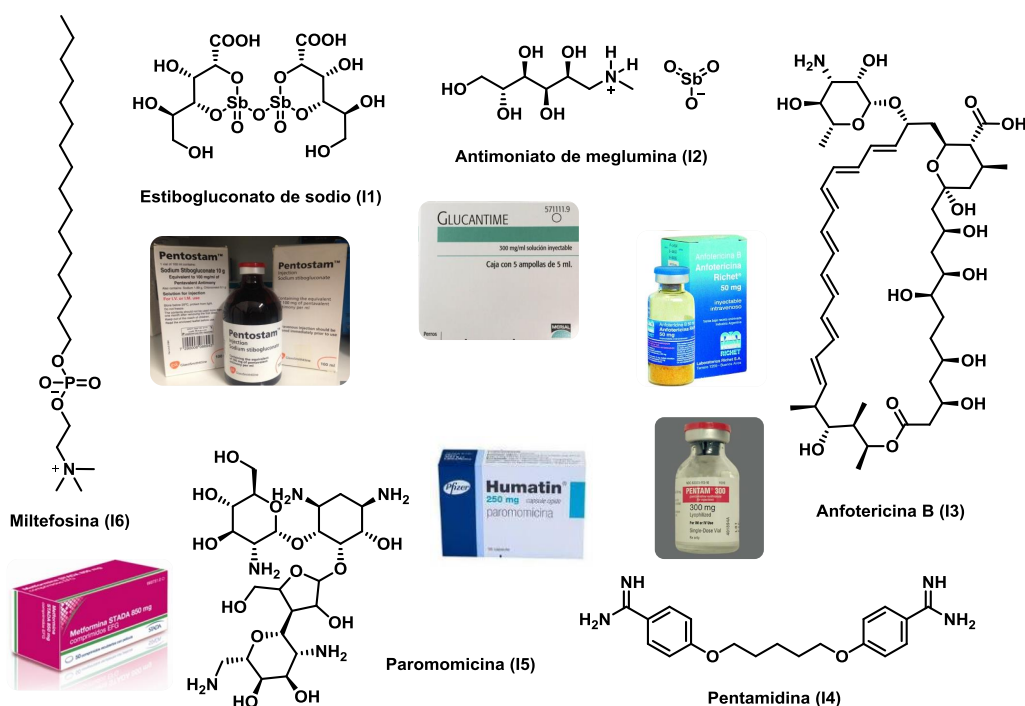


Figura I3. Fármacos actualmente aprobados para el tratamiento de la leishmaniasis.

- **Pentamidina (I4):**

Se trata de una diamina aromática sintetizada en los años 30 que se administra por vía intravenosa o intramuscular, y que actúa como inhibidor de la síntesis de poliaminas como putrescina o espermidina.² Este fármaco presenta graves y prolongados efectos secundarios como hipoglucemia, arritmia o fallo renal.

- **Paromomicina (I5):**

Este antibiótico con propiedades bactericidas descubierto en 1954, se ha empleado con éxito en los últimos años para el tratamiento tanto de LC por vía tópica, como para combatir la

LV mediante administración por vía parenteral.¹³ De nuevo, la dificultad de administración y los largos tiempos de tratamiento requeridos junto con los problemas de toxicidad, limitan enormemente un empleo más extenso de este fármaco.

- **Miltefosina (I6):**

Comercializado con el nombre de Miltex™ o Impavido™, este derivado de fosfocolina diseñado originalmente como agente anticancerígeno, fue aprobado en 2002 para el tratamiento de LV y se trata del primer y único fármaco antileishmania administrable por vía oral.¹⁴ Desde el punto de vista de su mecanismo de acción, la miltefosina es un inhibidor de la proteína quinasa B, una enzima que juega un papel fundamental en procesos celulares como el metabolismo de glucosa o la proliferación celular. A pesar de sus ventajas, su elevado tiempo de vida media en el organismo (cercano a una semana) lo hacen especialmente vulnerable a la aparición de resistencias. De hecho, a pesar del corto periodo de tiempo que lleva comercializado, países como Bangladesh o India ya han comenzado a describir tasas cercanas al 20% de pacientes que no han experimentado respuesta al tratamiento con miltefosina.

Por tanto, poniendo en valor en primer lugar los beneficios que ha supuesto el empleo de estos fármacos durante más de medio siglo, y que ha permitido controlar el elevado número de afectados por leishmaniasis en regiones poco desarrolladas con las dificultades que ello conlleva, los serios problemas de administración, baja eficacia, toxicidad y aparición de resistencias que se han ido describiendo para este obsoleto arsenal de fármacos (**Figura I3**), evidencian la necesidad de desarrollar terapias más eficaces para el tratamiento de la enfermedad. Cabe mencionar en este punto además la potencial relevancia en términos socioeconómicos que podría suponer el desarrollo de terapias antileishmania más eficaces aplicables, no sólo a humanos sino también en el ámbito veterinario, puesto que a pesar de la gravedad y frecuencia de aparición de esta infección en otros mamíferos como los cánidos, la administración sobre estas especies de terapias aplicadas en humanos se ve coartada por la necesidad de evitar el potencial y masivo desarrollo de resistencias del parásito que se asociarían irremediabilmente con una disminución de la eficacia de los tratamientos sobre personas.

I.1.3. Metabolismo redox de los tripanosomátidos y de los mamíferos

Analizando las particularidades de la biología celular de los tripanosomátidos en general, y del género *Leishmania* en particular, nos encontramos con sustanciales diferencias respecto a los mamíferos hospedadores que pueden suponer el punto de partida para el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces y selectivos. Algunas de estas peculiaridades residen en procesos como la glucólisis, la biosíntesis de esteroides o el metabolismo de poliaminas entre otros.¹⁵ No obstante, el metabolismo redox de tioles (**Figura I4**) representa tal vez uno de los sistemas más prometedores en la búsqueda de nuevos agentes antitripanosomátidos, debido

INTRODUCCIÓN

a las importantes diferencias genéticas, morfológicas y bioquímicas que presentan los parásitos en estos procesos con respecto a los huéspedes humanos.^{15,16} No es de extrañar por tanto, que los tratamientos actuales frente a las tripanosomiasis o a la leishmaniasis, se basen en fármacos como Nifurtimox, Melarsoprol o los mencionados antimoniales que actúan sobre el metabolismo redox de tioles.¹⁷

El análisis proteómico llevado a cabo en 2005 del material genético extraído de *L. major*,¹⁸ reveló la ausencia en esta especie de los genes que codifican tanto la glutatión reductasa (GR), como la tioredoxina reductasa (TrxR), dos enzimas fundamentales para la homeostasis intracelular de tioles en mamíferos. A diferencia de estos últimos, los tripanosomátidos basan su metabolismo redox en el ditio de bajo peso molecular tripanotión ($T[SH]_2$, N^1, N^8 -bis(glutationil)espermidina) (**Figura I4**). Esta molécula formada por dos unidades de glutatión unidas a través de un espaciador de espermidina, juega un papel fundamental en el equilibrio del estado redox intracelular del parásito, que puede verse alterado en mayor o menor medida, y durante periodos variables de tiempo, como consecuencia de un aumento de las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), entre otros factores.

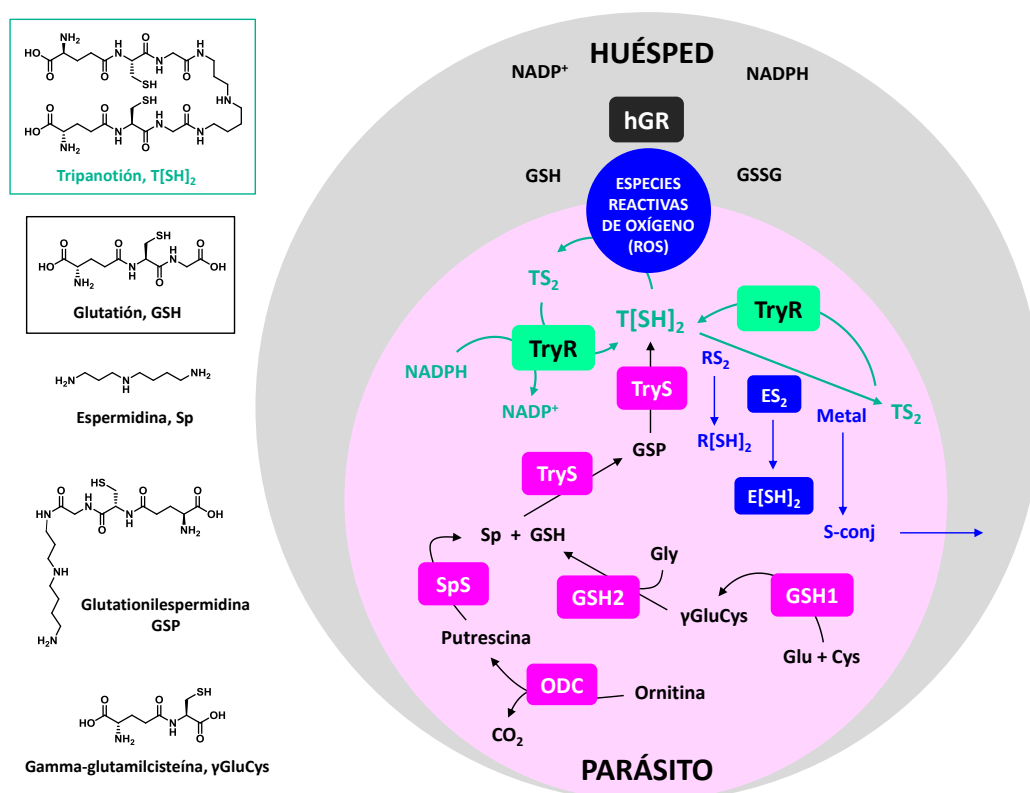


Figura I4. Metabolismo redox de tioles en *Leishmania*. La biosíntesis de tripanotión ($T[SH]_2$) se representa en **rosa** y en ella intervienen la ornitina descarboxilasa (ODC), la espermidina sintetasa (SpS), la γ -glutamylcisteína sintetasa (GSH1), la glutatión sintetasa (GSH2) y la tripanotión sintetasa (TryS). La regeneración de $T[SH]_2$ se representa en **verde** a través de la tripanotión reductasa (TryR), y la de glutatión GSH en **gris** gracias a la glutatión reductasa humana (hGR). Las especies intracelulares que reaccionan con $T[SH]_2$ se colorean en **azul**.

Además, la especie $T[SH]_2$ es la encargada de la detoxificación de metales pesados en el parásito, así como de la regeneración de metabolitos de bajo peso molecular ($R[SH]_2$), o de la recuperación de los centros activos de otras enzimas ($E[SH]_2$).¹⁹ Dada la importancia de la especie tripanotión para el correcto funcionamiento del sistema redox de los parásitos, las enzimas involucradas en su biosíntesis y regeneración se presentan como potenciales dianas celulares para el desarrollo de nuevos agentes antileishmania efectivos.¹⁵

La biosíntesis de $T[SH]_2$ (**Figura I4 rosa**), comprende en primer lugar la obtención de la molécula de glutatión GSH en dos pasos consecutivos catalizados por la γ -glutamilcisteína sintetasa (GSH1) y la glutatión sintetasa (GSH2), ambas reacciones dependientes de ATP. En segundo lugar, la doble funcionalización con glutatión del espaciador de espermidina (Sp) obtenido por la ruta de las poliaminas, conduce a la obtención de la especie $T[SH]_2$ en una reacción mediada por la tripanotión sintetasa (TryS).

En lo que se refiere a la regeneración de la especie reducida de tripanotión $T[SH]_2$ (**Figura I4 verde**), la tripanotión reductasa (TryR) es la única enzima que conecta los sistemas redox de NADPH y de tioles en los tripanosomátidos, estando ausente además en el mamífero hospedador donde la regeneración de tioles de bajo peso molecular se lleva a cabo mediante la enzima homóloga glutatión reductasa (hGR), encargada de regular el equilibrio entre las especies oxidada y reducida de glutatión (GSSG/GSH) (**Figura I4 gris**).

Teniendo en cuenta las enzimas involucradas en la síntesis y recuperación de tripanotión mostradas anteriormente, todas ellas podrían presentarse *a priori* como potenciales dianas celulares para el desarrollo de nuevos fármacos frente a las tripanosomiasis o la leishmaniasis. No obstante, la mayor parte de las aproximaciones empleadas en los últimos años en el campo de nuevos agentes antitripanosomátidos, se han centrado en la tripanotión sintetasa (TryS) y especialmente en la tripanotión reductasa (TryR), debido al carácter exclusivo y esencial que representan ambas enzimas para la supervivencia del parásito.¹⁵ La limitada información estructural disponible sobre la TryS, de la que sólo se posee una estructura cristalizada correspondiente a *L. major* (PDB: 2VPM)²⁰, junto con la actividad catalítica opuesta de sus dos dominios catalíticos (uno con actividad amidasa y otro con actividad sintetasa), y su complejo funcionamiento catalítico a través de un intermedio fosforilado de GSH, convierten a la TryR en una diana más accesible y prometedora para el desarrollo de inhibidores con actividad antiparasitaria.

I.1.4. La tripanotión reductasa (TryR) como diana terapéutica

La TryR comparte similitudes estructurales y mecanísticas con la enzima homóloga humana GR, con la que presenta una homología de secuencia cercana al 40%. A pesar de estas semejanzas, TryR y GR presentan una especificidad de sustrato mutuamente excluyente, o lo que es lo mismo, GR no es capaz de reducir la especie oxidada de tripanotión (TS_2), mientras

que TryR no es capaz de hacer lo propio con la forma oxidada de glutatión (GSSG).²¹ Esta distinción se basa fundamentalmente en las diferencias de tamaño, carga e hidrofobicidad de sus centros activos, dado que la molécula de tripanotión presenta un tamaño mayor, una carga neta positiva (+1) y una mayor hidrofobicidad debido al espaciador de espermidina, mientras que la molécula de glutatión posee un menor tamaño e hidrofobicidad y una carga neta negativa (-2).

La propuesta de TryR como una posible diana terapéutica, no sólo se fundamenta en la selectividad que posee con respecto a GR, sino también en el papel crucial que representa para la supervivencia del parásito. Así, se ha validado genéticamente²² el carácter esencial de esta enzima, y se ha observado que la reducción de su actividad a niveles inferiores al 50% en parásitos de *L. donovani* y *L. major*, se traduce en una disminución significativa de la capacidad proliferativa en el interior de macrófagos.^{23,24}

Todos estos hechos han permitido proponer desde los años 90 a la tripanotión reductasa (TryR) como una diana validada para la búsqueda de nuevos fármacos frente a la leishmaniasis.

- **Ciclo catalítico y estructura de la tripanotión reductasa de *L. infantum* (Li-TryR)**

La tripanotión reductasa es una oxidorreductasa dependiente de FAD que debe constituirse en su forma homodimérica, a partir de los correspondientes monómeros de 52 kDa, para ser biológicamente activa.

El ciclo catalítico de esta enzima consta de dos partes diferenciables en función del estado oxidado o reducido del centro activo, y consiste básicamente en la transferencia secuencial de electrones desde el NADPH al sustrato natural oxidado TS₂ a través de la coenzima FAD, mediante un mecanismo ping-pong¹⁹ (**Figura I5**).

Así, en un primer paso reductor se produce la unión de NADPH a la enzima y la posterior transferencia de electrones al anillo de isoaloxacina del FAD. A continuación, se produce la activación de la Cys52 (Li-TryR) catalíticamente activa, en un proceso oxidativo mediado por el par His461' - Glu466' como intermedios dadores/aceptores de protón. Simultáneamente, el poder reductor es transferido desde la riboflavina FAD al centro catalítico, produciéndose la ruptura del puente disulfuro Cys52 - Cys57 y generándose un complejo de transferencia de carga entre el tiolato de la Cys57 y el FAD. En ese proceso se libera además una molécula de NADP⁺ que es reemplazada por una nueva molécula de NADPH. Posteriormente y tras la entrada del sustrato natural oxidado TS₂ en el centro activo, se lleva a cabo la reacción entre la Cys52 activada y uno de los átomos de azufre de la molécula de tripanotión, formándose así un enlace disulfuro mixto.

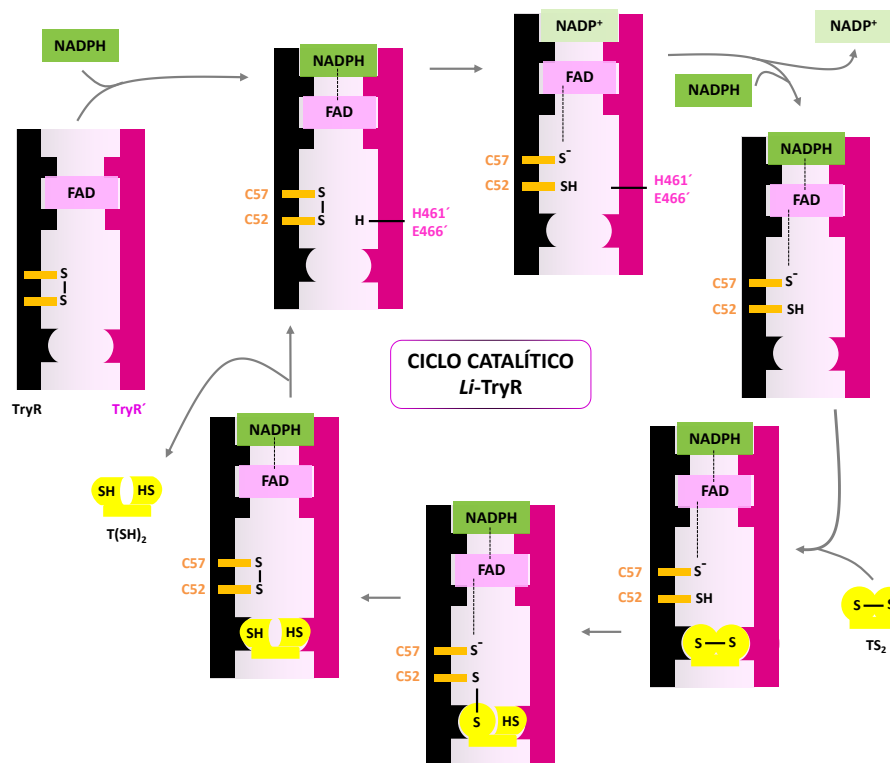


Figura I5. Ciclo catalítico de la TryR. Adaptación de la tesis de Miguel Ángel Toro.²⁵

Finalmente, se produce la restauración del puente disulfuro entre las cisteínas del centro catalítico y se libera la molécula de tripanotión reducido $T[SH]_2$.

Desde el punto de vista estructural, la tripanotión reductasa es una proteína multidominio donde se pueden distinguir 4 regiones diferenciadas: el centro activo, el sitio de unión de FAD, el sitio de unión de NADPH y la interfaz de dimerización²⁶ (**Figura I6**).

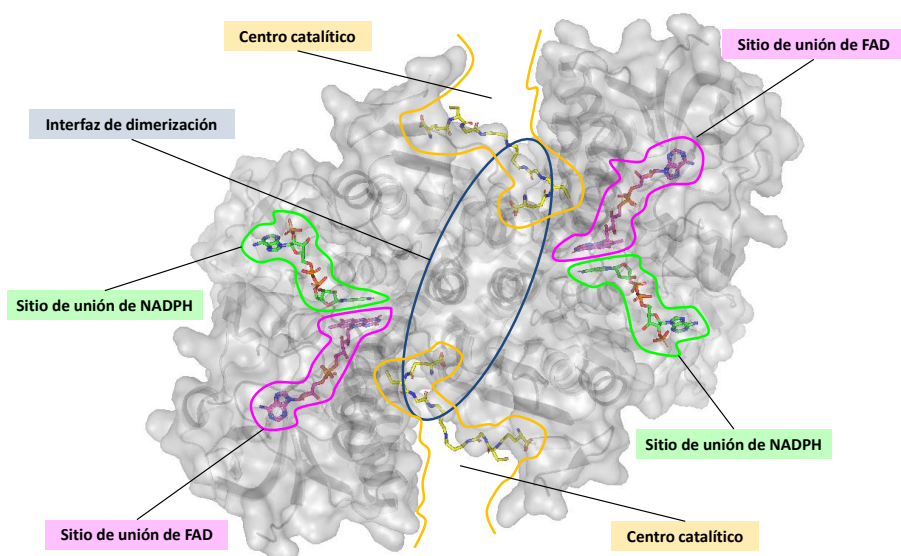


Figura I6. Estructura cuaternaria de la TryR de *L. infantum* en complejo con $T[SH]_2$ (amarillo), NADPH (verde) y FAD (rosa)(PDB:4ADW).²⁶

Profundizando en la estructura cuaternaria de la enzima, se puede observar en la figura anterior como ambos centros catalíticos simétricos están conformados por residuos de ambas subunidades. En su interior, los residuos de Cys52 y Cys57 mencionados anteriormente son los encargados de transmitir el poder reductor desde el NADPH a la molécula de tripanotión, a través de la coenzima FAD situada entre ambos dominios. Cabe mencionar en este punto que algunos fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis como los antimoniales pentavalentes anteriormente descritos, interaccionan covalentemente con estas cisteínas catalíticamente activas bloqueando su actividad, en algunos casos incluso de forma irreversible.

Volviendo al plano estructural, la diferente orientación espacial en *Li*-TryR y en hGR de las dos hélices más expuestas del centro activo es la responsable de las diferencias de tamaño que presentan ambos sitios, siendo el de la hGR significativamente más pequeño que el de *Li*-TryR (Figura I7).

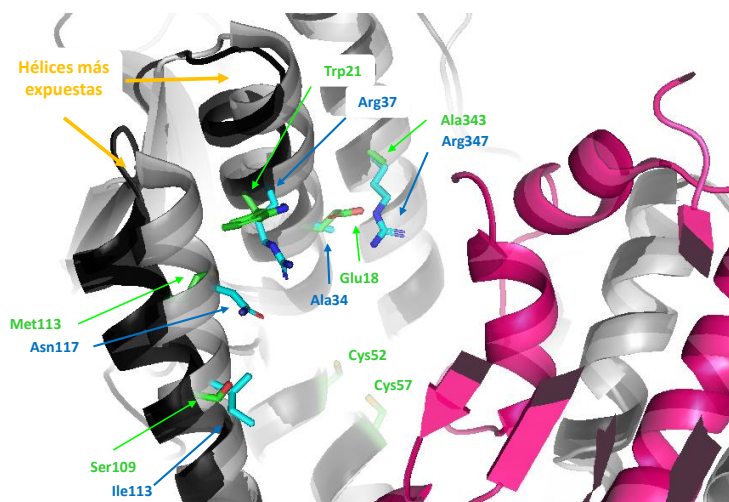


Figura I7. Centro activo de los homodímeros de *Li*-TryR (4ADW, negro y rosa) y de hGR (3GRS, gris y rosa). Los aminoácidos diferentes en *Li*-TryR se resaltan en verde con respecto a los de hGR (azul).

Los aminoácidos Glu18, Trp21, Ser109, Met113 y Ala343 del sitio catalítico de *Li*-TryR, se encuentran reemplazados por los residuos de Ala34, Arg37, Ile113, Asn117 y Arg347 respectivamente en hGR, lo cual junto con la diferencia de tamaño tiene consecuencias críticas para la especificidad de sustrato.²⁷ Por un lado, la sustitución de dos aminoácidos apolares de *Li*-TryR como Met113 y Ala343, por un aminoácido de cadena polar como Asn117, y otro cargado positivamente como Arg347, otorga una menor hidrofobicidad al conjunto del centro activo de hGR. Por otro lado, el reemplazo del Glu18 de *Li*-TryR junto con la introducción de dos argininas (Arg37 y Arg347) en hGR, invierte la carga neta de ambos sitios activos dejando al de *Li*-TryR cargado negativamente y al de hGR cargado positivamente, lo cual permite a su vez explicar afinidad de *Li*-TryR por T[SH]₂ (carga +1) y no por GSH (carga -2), y viceversa.

El conocimiento del mecanismo catalítico, de la estructura tridimensional, y de las diferencias de la tripanotión reductasa con la enzima humana, ha estimulado el desarrollo de una gran variedad de inhibidores selectivos capaces de interactuar en el amplio y expuesto centro activo de la enzima.

I.1.5. Inhibidores de la tripanotión reductasa

Se han descrito en los últimos años más de 1500 inhibidores de TryR^{26,27}, que suelen compartir como rasgos más relevantes la presencia de una carga formal positiva, un considerable volumen molecular, y una cierta hidrofobicidad en analogía con las propiedades del sustrato natural tripanotión. Los inhibidores descritos provienen fundamentalmente, o bien de campañas de cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening*, HTS), o bien de un diseño racional basado en la estructura del sustrato y/o del centro activo de la enzima. Esta última estrategia supone un desafío debido, entre otros factores, al gran tamaño del centro activo, que posibilita diferentes orientaciones de los ligandos o incluso la unión de más de una molécula, y a la elevada concentración de sustrato natural como potencial competidor presente en el interior de los tripanosomátidos (0.5 - 3 mM dependiendo de la especie y morfología del parásito).

Atendiendo a su cinética de reacción y/o su modo de unión, los inhibidores de TryR se pueden clasificar en tres grandes grupos: competitivos, subversivos e irreversibles. No obstante, algunos de ellos pueden presentar propiedades inhibitorias comunes a varios grupos.

Dentro de los **inhibidores competitivos** (Figura I8.A), cabe destacar en primer lugar los derivados de poliaminas diseñados en base al espaciador de espermidina que une las dos moléculas de glutatión en el tripanotión, y que han resultado ser inhibidores potentes y selectivos de TryR alcanzando valores de CI_{50} en el rango nanomolar.²⁸ Los derivados tricíclicos basados en esqueletos de acridina como la mepacrina²⁹, o de fenotiazina como la clorpromazina³⁰, así como sus análogos abiertos de 2-aminodifenilsulfuros³¹, son otro ejemplo de inhibidores competitivos de TryR. La cuaternización del grupo amino terminal de los derivados anteriores de clorpromazina y sus análogos abiertos³², ha dado lugar a una nueva serie de sales de amonio bi- o tricíclicas capaces de alcanzar valores de K_i de hasta 120 nM para la clorpromazina bencilada, evidenciando una vez más la importancia de la carga positiva para los inhibidores ortoestéricos de esta enzima. Sin embargo, estos compuestos por lo general no han mostrado una correlación clara entre los datos enzimáticos y su actividad antiparasitaria.

Por otro lado, los **inhibidores subversivos** (Figura I8.B) suponen una opción atractiva para el diseño de nuevos fármacos antiparasitarios ya que son capaces de convertir una enzima antioxidante como es la TryR, en una enzima pro-oxidante, dado que su interacción con la proteína no solo produce una disminución de la actividad enzimática sino que también

promueve la formación de radicales libres y/o la captura del *scavenger* de tripanotión reducido $T[SH]_2$. Así, dentro de esta categoría se han descrito principalmente derivados de 1,4-naftoquinonas sustituidas como menadiona o plumbagina³³, como inhibidores subversivos potentes de *T. cruzi* con constantes de inhibición en el rango micromolar bajo. Los análogos altamente conjugados de Nifurtimox (5-nitrofuranos)³⁴ o de 5-nitroimidazol³⁵, también muestran actividad potente frente a la TryR de distintas especies de *Trypanosoma*.

Finalmente, los **inhibidores irreversibles** (Figura 18.C) representan una alternativa interesante con respecto a los inhibidores competitivos reversibles especialmente, debido fundamentalmente, y como se ha mencionado anteriormente, a los elevados niveles intracelulares de sustrato natural.³³ Como ejemplos más representativos de este tipo de inhibidores, cabe destacar los compuestos organometálicos como los propios antimoniales pentavalentes⁴, los complejos de platino (II)-*terc*-piridina³⁶ y de paladio (II)-tiosemicarbazona³⁷, o compuestos glucosilados de oro como la auranofina³⁸, que han mostrado una inhibición irreversible de TryR al interactuar con las cisteínas del centro activo.

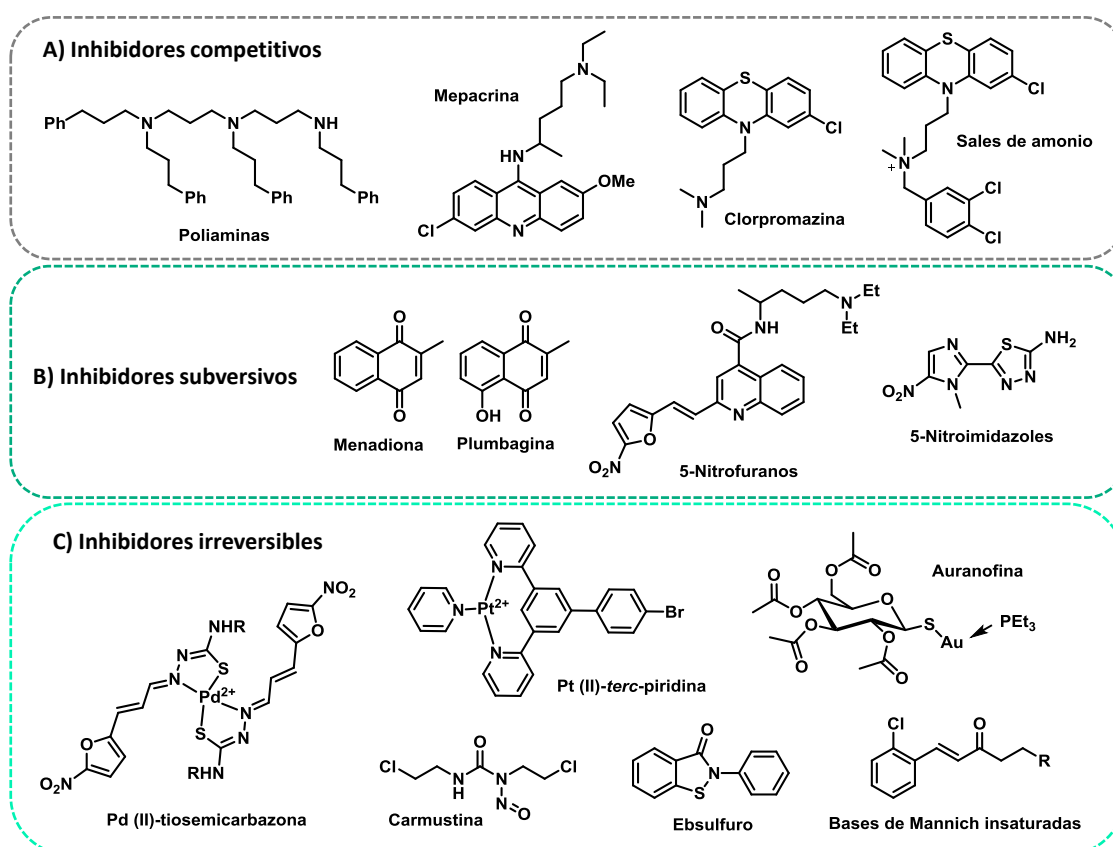


Figura 18. Ejemplos de los inhibidores de TryR más representativos descritos en la bibliografía.

Además, no sólo los compuestos organometálicos pueden presentar un modo de unión irreversible con TryR, sino que también se ha descrito ese comportamiento para compuestos orgánicos como carmustina³⁹, ebsulfuro⁴⁰ o bases de Mannich insaturadas⁴¹, portadores de

grupos fuertemente electrófilos capaces de formar un enlace covalente con los grupos tiol de las cisteínas catalíticamente activas.

Al margen de las categorías anteriores, cabe destacar también a los inhibidores que presentan un tipo de inhibición reversible tiempo-dependiente como el óxido de Melarsen⁴², para el que se postula una interacción en dos pasos con las cisteínas del centro activo, cuyo aducto organometálico puede ser revertido por la presencia de la forma reducida de T[SH]₂.

Tras esta breve descripción de la amplia variedad de inhibidores de TryR descritos, en los siguientes apartados se profundiza en aquellos compuestos de los que se dispone de información estructural basada en rayos X de los complejos cristalizados proteína-ligando, con el fin de comprender las interacciones responsables de la unión de estos inhibidores en el centro activo de la enzima.

- **Inhibidores basados en esqueletos tricíclicos**

La molécula de mepacrina (**17**), también conocida con el nombre de quinacrina, fue el primer inhibidor ($K_i = 19 \mu\text{M}$) cristalizado de *Tc*-TryR (*T. cruzi*, PDB no disponible).⁴³ El modo de unión de este ligando en el amplio centro activo de la enzima (**Figura 19.A**), reveló la interacción del esqueleto tricíclico de acridina con los residuos hidrófobos de Trp21, Met113 y Tyr110, los cuales conforman el denominado sitio de unión de mepacrina (*Mepacrine Binding Site*, MBS). El nitrógeno protonado a pH fisiológico del heterociclo, establece además un puente salino con el Glu18. Por último, el grupo dietilamino terminal interacciona mediante un enlace de hidrógeno, mediado por una molécula de agua, con el Glu466' del otro monómero.

Por otro lado, el análogo de mepacrina **18** ($K_i = 5.5 \mu\text{M}$) portador de un metileno extra en la cadena alifática, resultó 3 veces más activo que la mepacrina **17** probablemente debido a la interacción directa entre el grupo -NEt₂ y el Glu466', sin mediación de una molécula de agua.

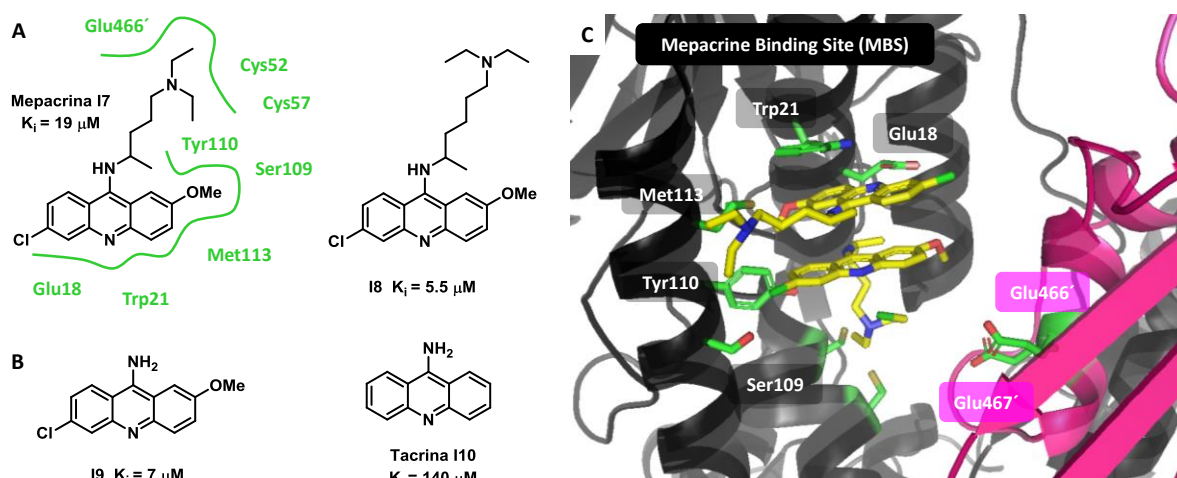


Figura 19.A: Modo de unión de la mepacrina (**17**) en el centro activo de *Tc*-TryR, y estructura química de su análogo extendido **18**; **B:** Derivados de tacrina **19** e **110**; **C:** Estructura cristalográfica (PDB: 1GXF) del complejo de mostaza de quinacrina y TryR (*T. cruzi*).

Los sustituyentes -Cl y -OMe del anillo tricíclico resultan de vital importancia para la unión de estos ligandos si comparamos la actividad del triciclo conjugado **I9** ($K_i = 7 \mu\text{M}$), con la de la tacrina **I10** ($K_i = 140 \mu\text{M}$) (**Figura I9.B**).

A pesar de que la estructura cristalográfica del complejo de mepacrina **I7**-Tc-TryR, reveló la presencia de única una molécula de ligando, los estudios cinéticos realizados en paralelo señalaban la posibilidad de que pudiese estar produciéndose la unión de más de una molécula de ligando al mismo tiempo.⁴³ Este hecho fue comprobado posteriormente tras la cocrystalización de la mostaza de quinacrina (PDB: 1GXF)⁴⁴, donde se pudo comprobar la presencia de dos moléculas de ligando apiladas en el centro activo de TryR, estableciendo interacciones con el MBS y el Glu18 entre otros residuos (**Figura I9.C**).

La posibilidad de albergar dos moléculas de ligando en el centro activo, no sólo evidencia el elevado volumen del mismo ($22 \times 20 \times 28 \text{ \AA}$), sino que ha animado al diseño de estructuras diméricas que puedan establecer un mayor número de interacciones y que puedan dar lugar por tanto a compuestos con una mayor afinidad. Un buen ejemplo de este planteamiento lo representa el análogo abierto de fenotiazina **I11**³¹ y su dímero derivado **I12**⁴⁵, como inhibidores de la Tc-TryR (**Figura I10**).

De acuerdo con estudios computacionales, la apertura del ciclo central de las fenotiazinas aumenta la flexibilidad de la estructura en comparación con la rigidez de los triciclos anteriores, permitiendo de esta manera la interacción de los dos anillos aromáticos de **I11** ($K_i = 27 \mu\text{M}$) con el residuo de Phe114, además de con los residuos que conforman el MBS. Por su parte, el anillo de piperazina establece dos puentes salinos con los Glu466' y Glu467' del otro monómero de la enzima (**Figura I10 izq**).

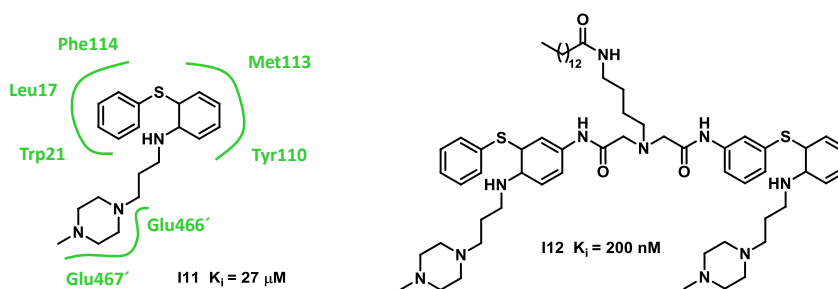


Figura I10. Estructura química y K_i (Tc-TryR) de la fenotiazina abierta **I11** y de su dímero simétrico **I12**.

El compuesto dimérico **I12** por su parte, portador de un espaciador de espermidina entre los difenilsulfuros, permitió mejorar la energía de unión del ligando **I12** ($K_i = 220 \text{ nM}$) en torno a 135 veces con respecto a la del prototipo monomérico **I11** (**Figura I10 dcha**).

- **Inhibidores derivados de azoles**

Algunos azoles como el compuesto **I13**, han demostrado ser inhibidores de la TryR de *L. infantum* en el rango micromolar bajo.⁴⁶ La estructura cristalizada del complejo **I13**-Li-TryR (PDB: 4APN) (**Figura I11**) reveló nuevamente una estequiometría 2:1 entre el ligando y la enzima, similar a la observada para la mostaza de quinacrina explicada anteriormente.

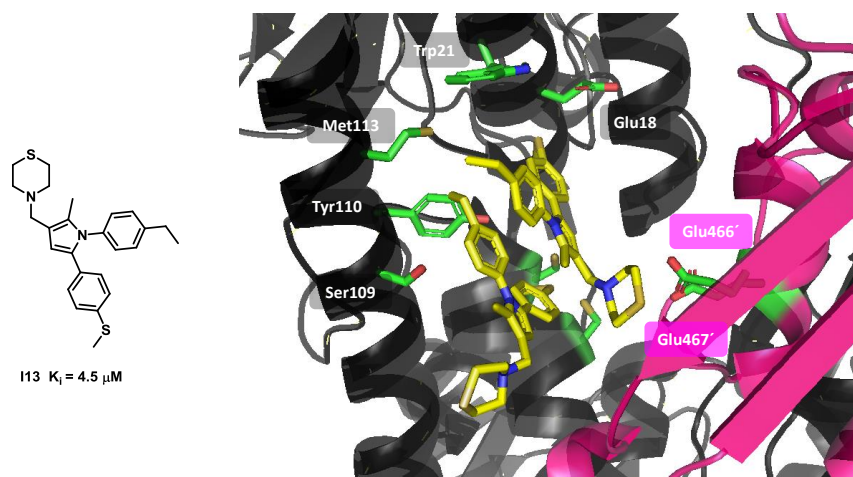


Figura I11. Centro activo de la Li-TryR en complejo con dos moléculas del inhibidor **I13** (PDB: 4APN).

Las dos moléculas de diarilpirrol apiladas en el sitio catalítico de la enzima establecen interacciones con residuos de ambos monómeros, siendo especialmente llamativas las interacciones electrostáticas entre el N cargado del anillo de tiomorfolina y los Glu466' y Glu467' de la otra subunidad. La superposición de esta estructura cristalina con la de T[SH]₂-TryR (PDB: 4ADW), demostró como el inhibidor y el sustrato natural compiten por la misma zona del centro activo.

- **Dihidroquinazolininas como inhibidores de TryR**

Mediante HTS se descubrió la correlación biológica que existía entre las propiedades inhibitorias frente a la TryR (*T. cruzi* y *T. brucei*), y la actividad antiparasitaria de compuestos de bajo peso molecular basados en el esqueleto de 3,4-dihidroquinazolina.⁴⁷ La posterior cocrystalización del ligando **I14** ($K_i = 0.92 \mu\text{M}$) con la Tb-TryR (*T. brucei*, PDB: 2WP5)⁴⁸, reveló la capacidad del ligando para inducir, en el centro catalítico de la enzima, un pequeño bolsillo hidrófobo en el entorno de la Tyr110 y de la Met113 donde alojar el grupo arilo (**Figura I12**).

Este novedoso resultado permitió comprobar la flexibilidad y capacidad de adaptación del centro activo de TryR, algo que no se había observado hasta ese momento. Además del desplazamiento de casi 5 Å del residuo de Met113 como consecuencia de la unión del ligando, cabe resaltar la disposición perpendicular del anillo de dihidroquinazolina respecto al residuo de Trp21, el cual solía disponerse de forma coplanar a los anillos aromáticos de los inhibidores tricíclicos anteriormente mencionados para establecer una interacción de tipo π -stacking.

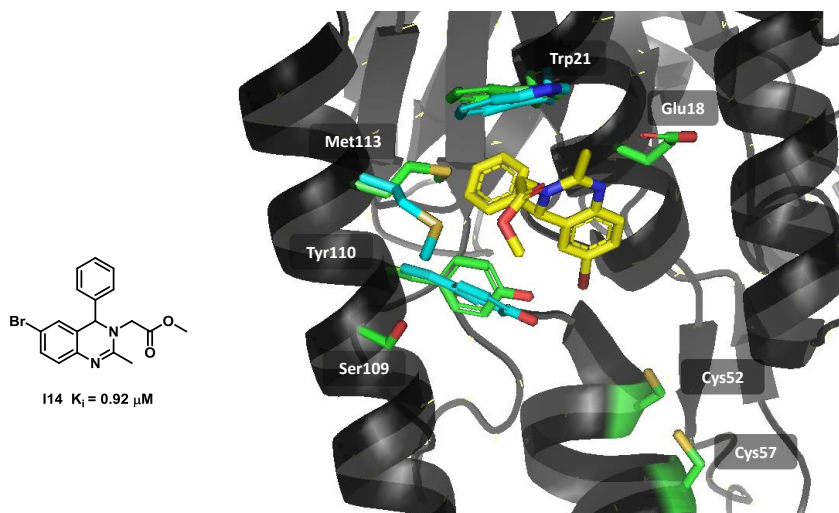


Figura I12. Centro activo de la *Tb*-TryR en complejo con el inhibidor **I14** (PDB: 2WP5). En **azul** los residuos desplazados con respecto a su posición original en **verde**.

Este tipo de compuestos cargados positivamente no resultaron activos frente a hGR (**I14**, $K_i = 100 \mu\text{M}$), evidenciando la importancia de la carga positiva de los ligandos para la discriminación de sustratos entre ambas enzimas.

- **Inhibidores basados en esqueletos de BTCP (Benzotienciclohexilpiperidina)**

Además de la mencionada pared hidrófoba del centro activo (MBS) donde se unen la mepacrina y todos los inhibidores descritos anteriormente, existe otra región del sitio catalítico menos explorada localizada justo enfrente de la MBS en el monómero opuesto, denominada sitio Z (**Figura I13.A**). Esta región constituida por los residuos de Phe396', Pro398' y Leu399', recibe este nombre por ser la zona de interacción de un grupo benciloxicarbonil (Z) empleado como sustituyente en una serie de derivados peptídicos de tripanotión, sintetizados por primera vez en 1987 por Henderson y col.⁴⁹

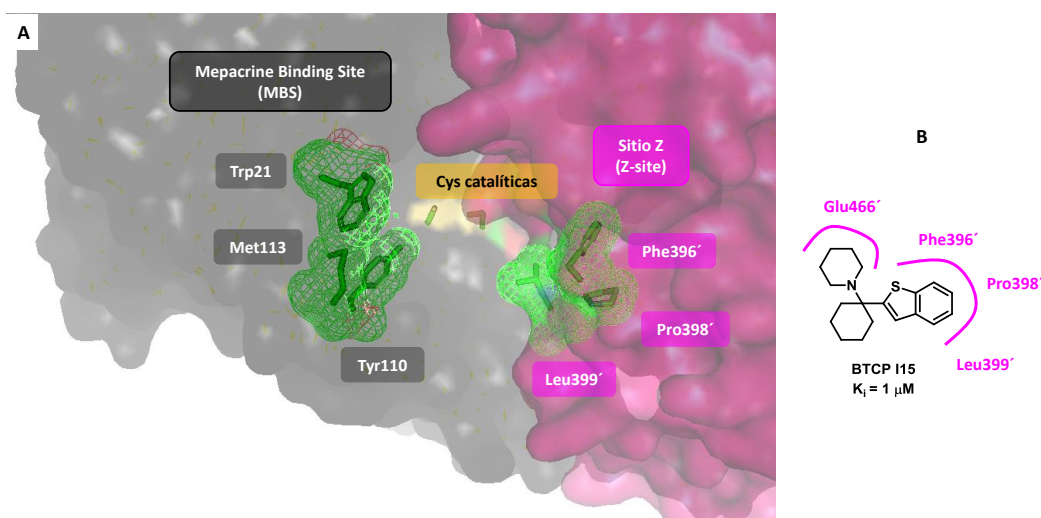


Figura I13.A: Centro activo de la *Li*-TryR (PDB: 2JK6) donde se compara el sitio de unión de mepacrina (MBS) (izquierda), con el sitio Z (**derecha**); **B:** Estructura e interacción del inhibidor BTCP **I15** en el sitio Z.

Los derivados de BTCP (*1-(1-(benzo(b)tien-2-il)ciclohexil)piperidina*, **I15**) se diseñaron originalmente como un ejemplo de inhibidores de TryR que podrían unirse al sitio Z, de acuerdo con los modelos computacionales propuestos en 2009 por Diedrich y col.⁵⁰ Según esa hipótesis, el N protonado a pH fisiológico del anillo de piperidina sería capaz de establecer una interacción electrostática con el Glu466', mientras que el heterociclo conjugado de benzotiofeno se alojaría en el mencionado hueco hidrófobo adyacente⁵¹ (**Figura I13.B**).

A partir del esqueleto de BTCP, se llevó a cabo posteriormente la preparación y estudios de R-X de diferentes análogos. De esta manera, la ciclohexilpirrolidina **I16** cocrystalizada en complejo con la TryR tanto de *T. brucei* (PDB: 4NEV) como de *T. cruzi* (4NEW)⁵², hizo reconsiderar la hipótesis inicial de unión en el sitio Z puesto que en ambas estructuras cristalizadas se observó la interacción del ligando con el MBS (**Figura I14.A**). Como puede apreciarse en la figura, la disposición del ligando en ambos cristales varía en función de la especie de *Trypanosoma* a la que pertenece la enzima, conservando en ambos casos la interacción electrostática entre el N del sustituyente de pirrolidina y el Glu18.

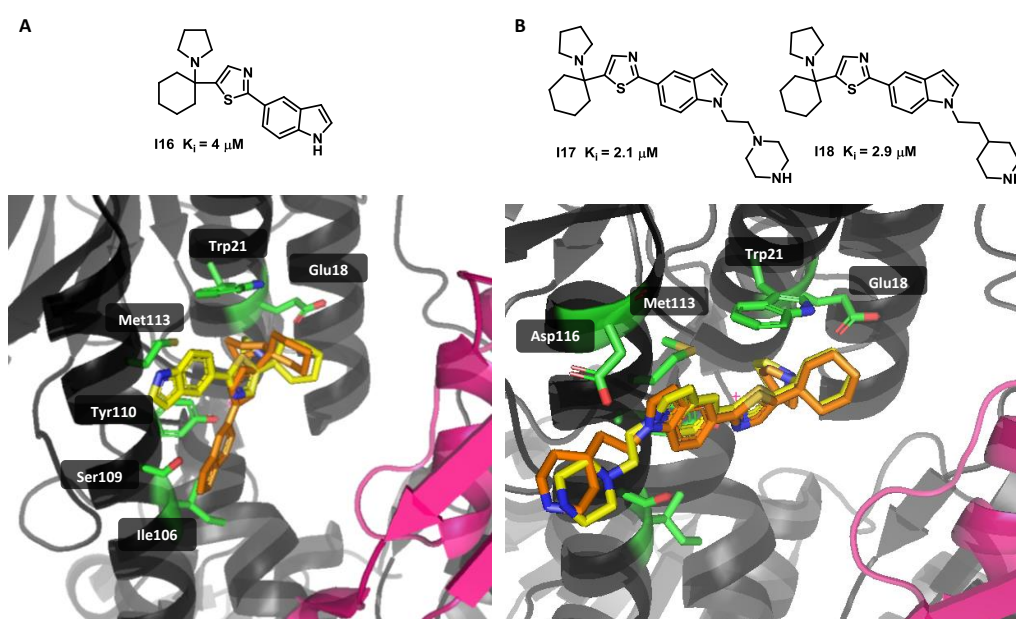


Figura I14.A: Estructura cristalizada de los complejos **I16** (amarillo) - TryR (*T. brucei*, 4NEV) e **I16** (naranja) - TryR (*T. cruzi*, 4NEW); **B:** Derivados de BTCP de segunda generación **I17** e **I18** cocrystalizados con la TryR de *T. brucei* (6BTL y 6BU7).

El desarrollo posterior de inhibidores basados en el prototipo **I16** con el objetivo de conseguir compuestos con mejor solubilidad acuosa, ha permitido obtener recientemente⁵³ dos estructuras cristalográficas de complejos de ligandos BTCP de segunda generación (**I17** e **I18**) con la TryR de *T. brucei* (PDB: 6BTL y 6BU7 respectivamente) (**Figura I14.B**). En ellas se puede observar la interacción del Glu18 con la carga positiva del anillo de pirrolidina, la interacción del esqueleto central con los residuos de Trp21 y Met113 que conforman el MBS, y

como novedad en estas estructuras, se aprecia una interacción electrostática adicional entre el Asp116 y los anillos terminales de piperidina o piperazina.

- **Auranofina**

Este fármaco empleado inicialmente como agente antirreumático ha sido propuesto en los últimos años como agente antiparasitario, representando así un claro ejemplo de reposicionamiento de fármacos como estrategia ampliamente utilizada en la búsqueda de nuevos candidatos clínicos frente a enfermedades olvidadas. Se ha comprobado además que este compuesto es un inhibidor potente e irreversible de la TryR ($K_i = 155$ nM). Estructuralmente, la auranofina (**I19**) consiste en un complejo de oro, trietilfosfina y un tioazúcar, y fue cocrystalizada en el año 2012 con la TryR de *L. infantum* en presencia de NADPH (PDB: 2YAU).³⁸ A pesar de la baja resolución del cristal (3.5 Å), la densidad electrónica observada mostró la interacción entre el átomo de oro y las cisteínas del centro catalítico, mientras que el resto glucosídico se extiende a lo largo del centro activo interaccionando con los residuos de Glu466' e His461' (**Figura I15**).

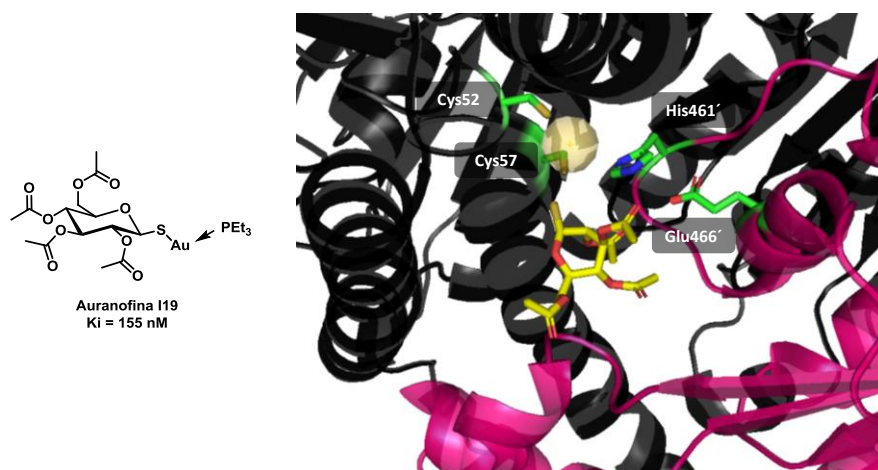


Figura I15.
Estructura
cristalizada de TryR
(*L. infantum*) en
complejo con
auranofina **I19** (PDB:
2YAU)

A pesar de los enormes esfuerzos llevados a cabo en los últimos años en la búsqueda de inhibidores efectivos de TryR, no se han logrado resultados satisfactorios en ensayos *in vivo* con ninguno de ellos. El hecho de que la actividad de la enzima deba reducirse a valores prácticamente residuales para comprometer la supervivencia de los parásitos, junto con los elevados niveles intracelulares del sustrato natural de tripanotión (0.3 - 3 mM dependiendo de la especie) y de la propia TryR (0.5 - 1.3 μ M), hacen que los inhibidores no competitivos o irreversibles resulten alternativas más atractivas para la inhibición de esta enzima.^{24,26}

I.2. ANTECEDENTES

I.2.1. Moduladores de IPPs: disruptores de la dimerización de *Li-TryR*

Teniendo en cuenta las limitaciones y desafíos que supone el diseño de inhibidores de TryR, y basándonos en el hecho de que esta enzima debe constituirse en su forma homodimérica para ser catalíticamente activa, nuestro grupo de investigación trabaja en los últimos años en una novedosa aproximación que consiste en la búsqueda de inhibidores de interacciones proteína-proteína (IPPs) entre ambas subunidades en la interfaz de dimerización de *Li-TryR*, como un mecanismo de inhibición alternativo a los conocidos hasta el momento.

Históricamente, el desarrollo de moduladores de IPPs ha supuesto un desafío en la campo de la Química Médica debido entre otros factores a la gran extensión de estas superficies proteicas (1500 - 3000 Å²), y a la ausencia de bolsillos definidos que dificultan el diseño de inhibidores, especialmente aquellos basados en moléculas pequeñas, capaces de interactuar en estas regiones consideradas como dianas difícilmente modulables (*undruggable targets*).⁵⁴ No obstante, el avance en el conocimiento acerca de la modulación de IPPs involucradas en procesos biológicos múltiples y esenciales, ha permitido en los últimos años abordar con éxito el desarrollo de inhibidores de IPPs potentes y selectivos, lográndose incluso resultados satisfactorios en clínica.⁵⁵ Un ejemplo de esta evolución es el inhibidor de Bcl-2 Venetoclax (Venclexta™), que representa el primer ejemplo de inhibidor de IPPs comercializado para el tratamiento de varios tipos de leucemia.⁵⁶ No es de extrañar por tanto que estos avances hayan animado a extender la búsqueda de moduladores de IPPs entre distintas proteínas, al caso concreto y más complejo de enzimas multiméricas tales como la ribonucleótido reductasa del virus herpes simplex⁵⁷, la adenilato quinasa de eritrocitos⁵⁸, o la proteasa⁵⁹ y la transcriptasa inversa⁶⁰ del VIH, mediante el diseño de compuestos que actúen en la interfaz de dimerización (**Figura I16**).

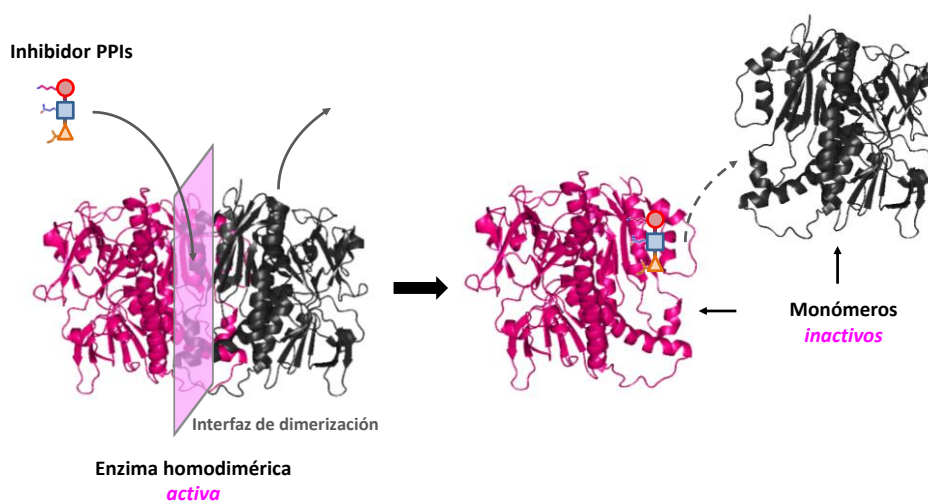


Figura I16. Estrategia general de inhibición de las interacciones proteína-proteína (IPPs) que rigen el equilibrio de dimerización de una proteína, en este ejemplo homodimérica.

Recientemente, esta estrategia se ha propuesto incluso como alternativa de inhibición de enzimas multiméricas de kinetoplástidos, como por ejemplo la triosafosfato isomerasa (TIM) entre otras, involucradas en el desarrollo de enfermedades tropicales olvidadas como la malaria, las tripanosomiasis o la propia leishmaniasis⁶¹. Este hecho complementa y refuerza la propuesta de inhibición de la dimerización de *Li-TryR* que lleva explorando nuestro grupo de investigación en los últimos años para el desarrollo de compuestos frente a la leishmaniasis.

Los progresos llevados a cabo en los últimos 30 años en el campo de las IPPs se deben especialmente al conocimiento de las estructuras tridimensionales y energías de unión que rigen estas interacciones proteicas. A pesar de la amplia extensión a lo largo de la cual se producen las IPPs, está generalmente aceptado que la energía de unión en estas superficies no se encuentra distribuida por igual a lo largo de ellas, sino que está focalizada en unos pocos aminoácidos que ejercen un papel crucial en la estabilización de la proteína. Estos residuos se denominan *hot spots* y suelen localizarse en regiones enterradas de la interfaz proteica, estableciendo interacciones por enlaces de hidrógeno, electrostáticas o hidrófobas, siendo estas últimas las más abundantes. Así, la predicción de *hot spots* se ha convertido en una herramienta fundamental en la búsqueda de disruptores de IPPs.

I.2.1.1 Análisis de la interfaz de dimerización de *Li-TryR*: identificación de *hot spots*

En el caso concreto de la búsqueda de disruptores de la dimerización de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (*Li-TryR*) llevada a cabo en nuestro grupo de investigación, en trabajos previos a esta tesis doctoral se realizaron en primer lugar estudios computacionales en colaboración con el grupo del Prof. Federico Gago (Universidad de Alcalá) para la identificación de *hot spots* de la interfaz de dimerización. En estos estudios se determinó tanto la contribución energética (electrostática y de Van der Waals) como la superficie accesible al disolvente (SASA), de cada uno de los residuos que constituyen la interfaz de dimerización. Aquellos residuos que mostraron una mayor contribución energética para la estabilización global del homodímero, se propusieron como potenciales *hot spots* para dicha unión. De todos los residuos del dominio de dimerización estudiados, los aminoácidos Trp81, Glu436 y Gln439 fueron los que mostraron una mayor aportación a la estabilidad del dímero. El Trp81 se encuentra situado en el dominio de unión a FAD, mientras que los residuos de Glu436 y Gln439 se encuentran en el dominio de dimerización del mismo motivo estructural, una hélice α definida por la secuencia Pro435 - Met447 (**Figura I17 izq**).

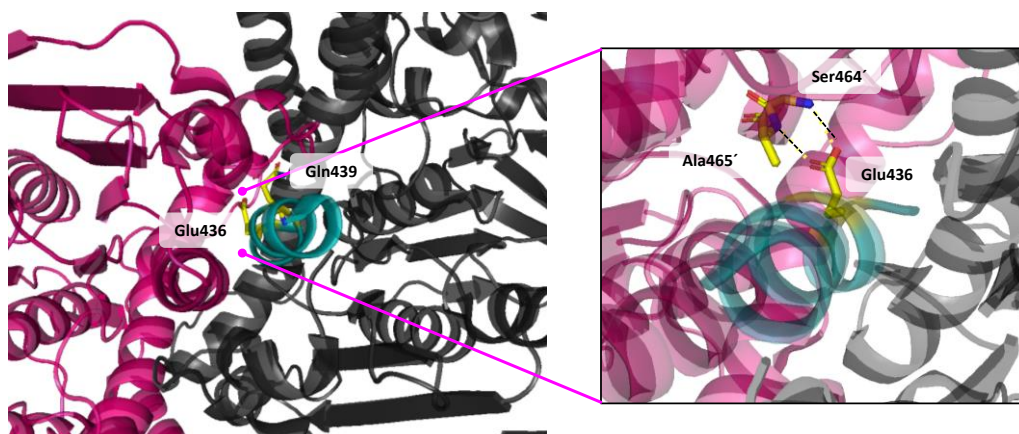


Figura I17. Glu436 y Gln439 propuestos inicialmente como *hot spots*, localizados en la hélice α (Pro435-Met447) de color azul. Interacciones del Glu436.

Con el fin de validar el carácter esencial de los tres residuos anteriores para la conformación y estabilidad de la enzima, se llevaron a cabo estudios de oligomerización y de medida de la actividad catalítica con las enzimas mutadas en estos aminoácidos por alanina. Estos estudios de mutagénesis dirigida sirvieron para validar el residuo Glu436 como elemento clave para la estabilidad funcional y estructural del dímero de *Li-TryR*, y por consiguiente como *hot spot* del proceso de dimerización⁶² (**Figura I17 dcha**).

I.2.1.2 Péptido lineal prototipo **P1**. Prueba de concepto

Una vez confirmado el residuo Glu436 como *hot spot* para el proceso de dimerización de la enzima, se llevó a cabo en nuestro grupo de investigación el diseño y síntesis de una pequeña librería de péptidos lineales derivados de la hélice α (PEIIQSVGICMKM) que contenía dicho residuo⁶² (**Figura I18**). De esta manera, en primer lugar se sintetizó el péptido lineal **I20** (Ac-PEIIQSVGISM^{red}MM-NH₂) constituido por la misma secuencia de aminoácidos que la hélice original, salvo por la sustitución de la cisteína original C10 por una serina (S10) con el fin de evitar potenciales problemas de oxidación (**Figura I18**). Las propiedades inhibitorias de la actividad oxidorreductasa de *Li-TryR*, se midieron mediante un ensayo colorimétrico. La capacidad de los péptidos para inhibir el proceso de dimerización de la enzima, se evaluó en un novedoso ensayo enzimático desarrollado por el grupo del Prof. Antonio Jiménez (Universidad de Alcalá), basado en la detección de la especie dimérica en presencia de potenciales efectores del homodímero. Ambos ensayos se describirán con más detalle en la evaluación biológica del **Capítulo 1**. En este último ensayo, el péptido lineal **I20** mostró la capacidad de inhibir el proceso de dimerización de la enzima en el rango micromolar ($CI_{50} \text{ dim} = 41.6 \pm 4.0 \mu\text{M}$).⁶²

A la vista de estos prometedores resultados, se sintetizó una pequeña quimioteca de péptidos lineales modificados secuencialmente en su estructura con el fin de aumentar la actividad con respecto a la del péptido anterior.

Así, la sustitución en el péptido **I20** del glutámico E2 por un residuo de lisina (K), dio lugar al péptido **I21** (Ac-PKIIQSVGISMKM-NH₂) que resultó ser más potente que el péptido precursor **I20** tanto en el ensayo de actividad (Cl_{50} act = 1.8 ± 0.3 μ M), como en el ensayo de dimerización (Cl_{50} dim = 17.9 ± 0.6 μ M) de la enzima.

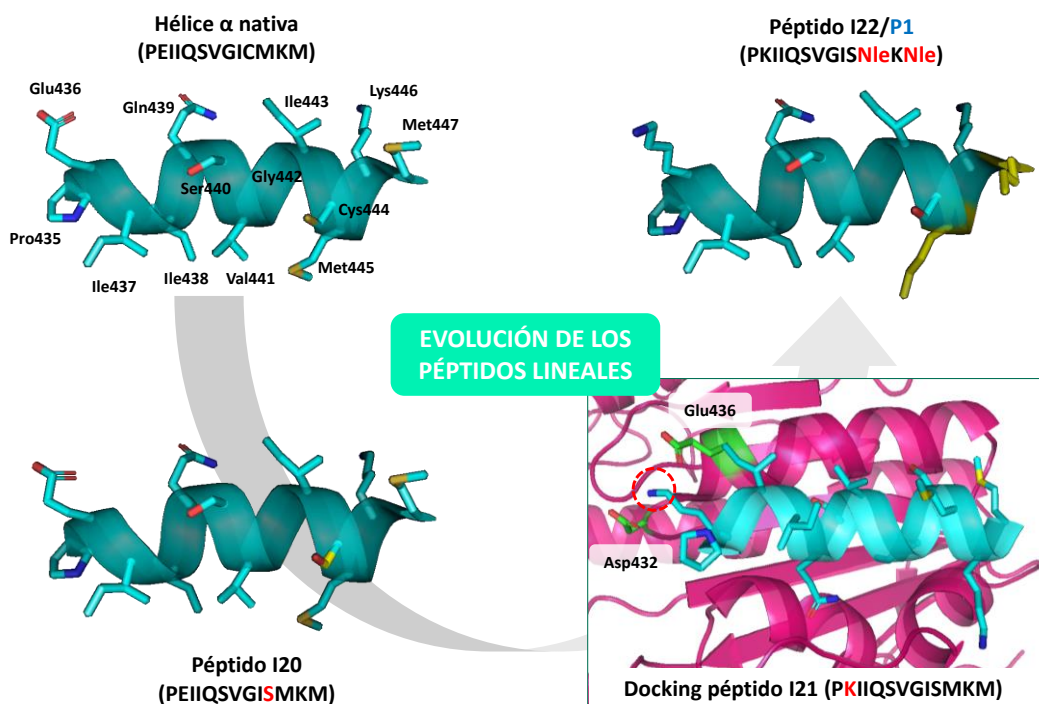


Figura I18. Evolución en el diseño de péptidos lineales desde la hélice α nativa que contiene el *hot spot* Glu436, hasta el péptido prototipo **P1**. Se muestra el *docking* del péptido **I21** sobre uno de los monómeros de *Li-TryR* (2JK6).

Los estudios computacionales de *docking* llevados a cabo con el péptido lineal **I21** permitieron racionalizar y explicar la mejora de actividad de este péptido con respecto al péptido **I20** en el ensayo de dimerización, en base a la interacción electrostática observada entre la cadena lateral del residuo de de Lys2 con el carboxilato de los residuos Asp432, y especialmente con el *hot spot* Glu436 (**Figura I18**).⁶²

Finalmente, con el objetivo de aumentar la estabilidad química de los péptidos se decidió sintetizar el péptido **I22** (Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH₂), portador de dos aminoácidos no-naturales de norleucina (Nle) en lugar de los residuos de Met11 y Met13 fácilmente oxidables. Este péptido mostró los mejores valores de inhibición hasta el momento en ambos ensayos enzimáticos (Cl_{50} act = 1.5 ± 0.2 μ M, Cl_{50} dim = 7.0 ± 0.6 μ M), convirtiéndose en el péptido prototipo **P1** que ha servido de referencia para trabajos posteriores, incluido el desarrollado en esta tesis doctoral.⁶²

Los resultados obtenidos con estos péptidos lineales permitieron realizar la prueba de concepto y validar la disrupción del proceso de dimerización como una nueva estrategia de inhibición de la TryR de *L. infantum*. Sin embargo, estos péptidos lineales no mostraron

actividad leishmanicida en cultivo celular de parásitos probablemente debido a una baja permeabilidad celular. Además, estudios estructurales de dicroísmo circular y de RMN realizados con el péptido **P1**, pusieron de manifiesto la baja helicidad en disolución del mismo que podría dar lugar a problemas de estabilidad proteolítica. Por tanto, con el fin de obtener compuestos con mejores propiedades farmacocinéticas y de estabilidad frente a la proteólisis que los prototipos lineales, se decidió abrir a continuación una nueva línea de investigación dirigida a la búsqueda de peptidomiméticos capaces de mimetizar la estructura secundaria de hélice α , siguiendo estrategias conocidas en el campo de las interacciones proteína-proteína.

1.2.1.3 Peptidomiméticos como disruptores de la dimerización de Li-TryR

Los peptidomiméticos son moléculas diseñadas para mimetizar las características estéricas y químicas de péptidos bioactivos, a través de moléculas orgánicas con mejores propiedades como fármaco (propiedades *druglike*).

Desde un punto de vista clasificatorio, los peptidomiméticos se pueden catalogar en diferentes grupos en base a criterios como el tipo de estructura secundaria que imitan, o la similitud estructural que conservan con respecto a la arquitectura peptídica original.⁶³

Atendiendo a la primera clasificación, los miméticos de hélice α , dentro de los que se encuentran las estructuras empleadas como antecedentes a esta tesis doctoral, son uno de los tipos de peptidomiméticos más descritos en la bibliografía puesto que las hélices representan el motivo estructural más común en los dominios proteicos, mientras que las láminas β y giros β son plegamientos presentes en una menor proporción. Así, aproximadamente entre un 30 y un 40% de las estructuras secundarias constituyentes de proteínas son hélices, y ese porcentaje se eleva a un 62% cuando se evalúa su presencia en interfaces proteicas donde se producen fenómenos de reconocimiento proteína-proteína.^{64,65} No es de extrañar por tanto que la búsqueda de miméticos de hélice α sea un campo de investigación muy activo en la última década y de gran interés.^{66,67}

Por otro lado, en base al grado de similitud con la estructura peptídica original, los peptidomiméticos se han clasificado tradicionalmente en tres tipos. Los miméticos **Tipo I** son péptidos cortos que mimetizan la estructura secundaria del péptido bioactivo con alteraciones mínimas en la secuencia, mientras que los de **Tipo II** en cambio son miméticos funcionales no peptídicos que no imitan necesariamente la estructura secundaria original del péptido. Finalmente, los miméticos **Tipo III** son moléculas no peptídicas que reproducen la topología espacial de los residuos clave para la interacción del péptido original.⁶⁸ Más recientemente Grossmann y col⁶⁹ ampliaron esta clasificación a cuatro grandes grupos (A, B, C y D) atendiendo al mismo criterio de similitud en la naturaleza peptídica, siendo los miméticos de clase C y D los más alejados en la escala (**Figura I19**).

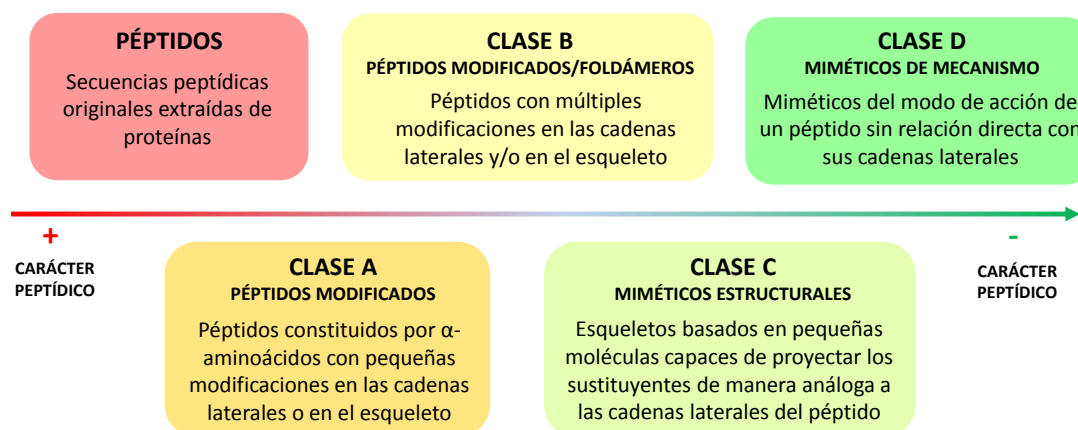


Figura I19. Clasificación de los peptidomiméticos de acuerdo con Grossmann y col.⁶⁹

Mientras que los miméticos de clase A y B han sido comúnmente empleados como aproximaciones químico médicas en el diseño de peptidomiméticos, los de clase C y aquellos de clase D que se rigen por un modelo farmacofórico, utilizan una aproximación biofísica de diseño más innovadora y actualmente en auge en el diseño de inhibidores de IPPs, basada en la reproducción espacial de la conformación bioactiva del péptido.⁷⁰

Con el fin de obtener peptidomiméticos con mejor permeabilidad celular y estabilidad proteolítica que el péptido lineal prototipo **P1**, en trabajos de investigación previos a esta tesis doctoral se prepararon y estudiaron péptidos cíclicos conformacionalmente restringidos (clase A) y foldámeros (clase B), como disruptores de la dimerización de *Li-TryR*.

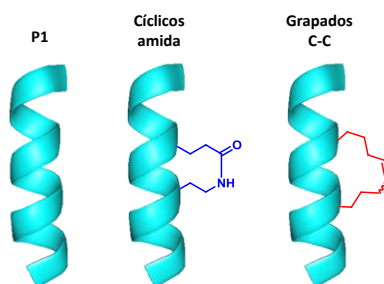
• Péptidos cíclicos

Partiendo del péptido prototipo **P1** (Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH₂), en primer lugar se diseñó y sintetizó una librería de péptidos cíclicos de distinta longitud, conformacionalmente restringidos mediante la introducción de cierres covalentes amida e hidrocarbonados entre las cadenas laterales de los residuos *i* e *i*+4, en distintas posiciones del polipéptido a un paso de vuelta de hélice.⁷¹⁻⁷³ Se ha descrito en la literatura que el empleo de péptidos grapados C-C puede aumentar la helicidad, la estabilidad proteolítica, la afinidad por la diana y especialmente la permeabilidad celular de los mismos en comparación con los correspondientes péptidos lineales.^{66,74}

Comenzando con los péptidos cíclicos amida, en nuestro grupo de investigación se exploraron todas las posibles posiciones de ciclación entre aminoácidos situados en la cara de no interacción con la enzima, así como distintas longitudes del péptido. Los mejores resultados de actividad biológica se obtuvieron para los péptidos de 13 aminoácidos (13-mer) ciclados entre las posiciones 3,7 (**I23**) y 4,8 (**I24**) (**Tabla I1**). Tras la optimización de la longitud del péptido y de la posición del puente⁷¹, se llevó a cabo la preparación de los correspondientes péptidos conformacionalmente restringidos mediante puentes hidrocarbonados⁷² (**I25** e **I26**).

En la **Tabla I1** se recogen los valores de Cl_{50} obtenidos en los ensayos enzimáticos de actividad y dimerización con los péptidos cíclicos más activos y representativos, así como sus valores de helicidad obtenidos mediante dicroísmo circular en disolución acuosa, y los tiempos de vida media frente a una proteinasa de amplio espectro (proteinasa K). Los valores mostrados para los péptidos grapados C-C corresponden a los del isómero mayoritario E teniendo en cuenta la posible esteoquímica del doble enlace de la grapa.

Tabla I1. Valores de $Cl_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM) obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y dimerización del péptido lineal de referencia **P1**, y de los péptidos cíclicos más representativos **I23** - **I26**.



Péptido	Estructura	$Cl_{50} \text{ act}$ (μM) ^b	$Cl_{50} \text{ dim}$ (μM) ^b	Helicidad (%) ^c	$t_{1/2}$ (min) ^d
P1	Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	1.5 \pm 0.2	7.0 \pm 0.6	1.5	23
Cíclicos amida	I23 Ac-PK(EQSK)GISNleKNle-NH ₂	0.9 \pm 0.1	9.9 \pm 1.6	40	52
	I24 Ac-PKI(EQSVK)ISNleKNle-NH ₂	5.3 \pm 0.8	14.4 \pm 1.8	55	64
Grapados C-C (Isómero E) ^a	I25 Ac-PK(AIQSA)GISNleKNle-NH ₂	7.2 \pm 0.4	Estabilizador	12	418
	I26 Ac-PKI(AQSV A)ISNleKNle-NH ₂	7.4 \pm 0.7	Estabilizador	26	212

^a Isómero E mayoritario. ^b Concentración inhibitoria necesaria para disminuir al 50% la actividad de la enzima o al 50% la formación del homodímero. ^c Helicidad determinada mediante dicroísmo circular. ^d Tiempos de vida media frente a proteinasa K.

En todos los casos se observaron valores de actividad en el rango micromolar bajo, en los que destacó el peptidomimético **I23** con valores de $Cl_{50} \text{ act}$ similares a los del prototipo lineal **P1**. Sin embargo, la naturaleza del puente influyó de manera determinante en el ensayo de dimerización, ya que los péptidos cíclicos amida se comportaron como disruptores potentes de la dimerización, mientras que los péptidos grapados C-C resultaron ser estabilizadores del homodímero.

Desde un punto de vista estructural, los estudios de dicroísmo circular mostraron un aumento notable de la helicidad para todos los péptidos cíclicos con respecto al prototipo lineal **P1**, especialmente para los cíclicos amida **I23** e **I24**, lo que parece indicar que este tipo de grapa es más efectiva para la estructuración helicoidal de los péptidos en disolución.

Finalmente, en cuanto a los estudios de estabilidad proteolítica se observó una mejora significativa de todos los peptidomiméticos respecto al péptido lineal **P1**, especialmente para los péptidos grapados C-C **I25** e **I26**.

No obstante y a pesar de las mejoras, ninguno de estos derivados mostró actividad leishmanicida en cultivo celular.

- **Foldámeros (α,β^3 -péptidos)**

Paralelamente al desarrollo de los péptidos cíclicos anteriores, se estudió también el empleo de foldámeros (péptidos α/β) como peptidomiméticos de Tipo I o clase B de acuerdo con la clasificación de Grossmann y col,⁶⁹ con el mismo objetivo de obtener compuestos con mejor estabilidad proteolítica y permeabilidad celular.

Así, se sintetizó una pequeña librería de péptidos α/β de distinta longitud,⁷⁵ donde se sustituyeron α -aminoácidos naturales por β^3 -aminoácidos que permitieron mantener las correspondientes cadenas laterales responsables de la interacción del péptido prototipo **P1** con la *Li-TryR*. Los patrones de sustitución empleados a la hora de introducir esos β -aminoácidos en la secuencia original fueron los $\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$ y $\alpha\alpha\alpha\beta$ descritos por Gellman,⁷⁶ ampliamente utilizados en la síntesis de foldámeros como miméticos de hélice α aplicados a inhibidores de IPPs.⁷⁷

En la **Tabla I2** se recogen las secuencias de los foldámeros más representativos así como los valores enzimáticos de Cl_{50} act y Cl_{50} dim obtenidos para algunos de los derivados más relevantes.

Tabla I2. Valores de $Cl_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM) obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y dimerización del péptido lineal de referencia **P1**, y de los foldámeros más representativos **I27** - **I29**.

Péptido	Estructura	Cl_{50} act (μM) ^a	Cl_{50} dim (μM) ^a	$t_{1/2}$ (min) ^b
P1	Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	1.5 \pm 0.2	7.0 \pm 0.6	23
Patrón $\alpha\alpha\beta\alpha\alpha\beta$	I27 Ac-PKI β^3 IQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	3.6 \pm 0.2	11.9 \pm 1.3	215
	I28 Ac- PK β^3 IIQ β^3 SVGI β^3 SNleK β^3 Nle-NH ₂	3.5 \pm 0.3	21.7 \pm 1.3	517
Patrón $\alpha\alpha\alpha\beta$	I29 Ac-PK β^3 IIQS β^3 VGIS β^3 NleKNle-NH ₂	21.1 \pm 0.8	11.2 \pm 1.3	<15

^a Concentración inhibitoria necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima o el 50% de la formación del homodímero. ^b Tiempos de vida media frente a proteinasa K.

A la vista de los resultados se concluyó que los foldámeros **I27** e **I28** resultaron ser inhibidores potentes, con valores de Cl_{50} en el rango micromolar similares al péptido de referencia **P1** en ambos ensayos.

En los estudios de estabilidad proteolítica de estos foldámeros frente a proteinasa K, se observó una gran variación en los tiempos de vida media de los mismos dependiendo de la posición del residuo no natural β^3 , apreciándose también aumentos muy significativos en el tiempo de vida media de hasta 10-20 veces superiores al péptido **P1** en el caso de **I27** e **I28**.

Desafortunadamente, estos compuestos tampoco fueron capaces de mostrar actividad leishmanicida en cultivo celular frente al parásito.

Estudios de microscopía confocal de los péptidos y peptidomiméticos anteriores, conjugados con un marcador fluorescente de fluoresceína, confirmaron la incapacidad de dichas estructuras peptídicas para acceder al interior del parásito. Con el fin de mejorar la permeabilidad celular, nos planteamos la conjugación de los peptidomiméticos con péptidos de penetración celular (*cell-penetrating peptides*, CPPs).⁷⁵

• Conjugados de péptidos/peptidomiméticos con CPPs para ensayos en cultivo celular

Como CPPs se eligieron las secuencias de poliargininas (**R₉**) y TAT (GRKKRRQRRRPQ), que se conjugaron con el péptido prototipo **P1** y con los peptidomiméticos más prometedores obtenidos hasta ese momento. La evaluación biológica de los conjugados más relevantes^{72,75} en cultivo celular frente a las distintas formas de parásito así como en células humanas THP-1, se recoge en la **Tabla I3** como valores de CE₅₀ de actividad leishmanicida y toxicidad.

Tabla I3. Valores de CE₅₀ ± DE (desviación estándar) (μM) de los péptidos y peptidomiméticos **P1**, **I23**, **I25** e **I28** conjugados con el péptido de penetración celular (CPP) de poliargininas (**R₉**), frente a promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y su citotoxicidad frente a la línea humana THP-1.

Compuesto	Secuencia	CE ₅₀ promastigotes (μM) ^c	CE ₅₀ amastigotes (μM) ^c	CE ₅₀ THP-1 (μM) ^c	IS ^d
Miltefosina	/	47.6 ± 0.6	2.0 ± 0.1	19 ± 1.6	<1 9.5
CPP ^a	RRRRRRRRR	>25	>25	>25	/
Conjugado lineal R ₉ -P1 ^b	R ₉ -PKIIQSVGISNleKNle-NH ₂	4.6 ± 0.2	3.5 ± 0.9	1.7 ± 0.5	<1 <1
Conjugado cíclico amida R ₉ -I23 ^b	R ₉ -PK-c[(CH ₂) ₂ CONH(CH ₂) ₄] ^{3,7} [EIQSK]GISNLKNL ^c	3.5 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.5 ± 0.8	<1 <1
Conjugado cíclico grapado C-C R ₉ -I25 ^b	R ₉ -PK-c[(CH ₂) ₃ CH=CH(CH ₂) ₃] ^{3,7} [A*IQSA*]GISNleKNle ^c	1.95 ± 0.14	2.14 ± 0.5	0.3 ± 0.1	<1 <1
Foldámero conjugado R ₉ -I28 ^b	R ₉ -PKβ ³ IIQβ ³ SVGIβ ³ SNleKβ ³ Nle	0.98 ± 0.02	1.9 ± 0.5	5.8 ± 1.4	5.9 3.1

^a Péptido de penetración celular de poliargininas. ^b Conjugados CPP-péptido. ^c Concentración necesaria para inhibir al 50% el crecimiento de los parásitos o de las células humanas. ^d Índice de selectividad: cociente entre los valores de CE₅₀ en promastigotes y amastigotes y los de THP-1.

El péptido policationico de argininas (**R₉**) por sí mismo no mostró actividad leishmanicida. Sin embargo, los conjugados tanto del péptido lineal **P1** como de los péptidos cíclicos y foldámeros, sí mostraron valores de CE₅₀ en el rango micromolar bajo frente a promastigotes y amastigotes, similares o incluso inferiores a los del fármaco comercial miltefosina. No obstante, todos ellos resultaron tóxicos mostrando valores bajos de selectividad, a excepción del foldámero conjugado **R₉-I28** que presentó unos índices de selectividad (IS) de 3 - 5.

Los estudios de microscopía confocal de los conjugados peptídicos anteriores con CPPs y fluoresceína, permitieron visualizar la internalización efectiva de los compuestos en el interior del parásito.

Estos resultados supusieron la prueba de concepto, en cultivo celular, de la capacidad de estos péptidos moduladores de la dimerización de *Li-TryR*, para comportarse como agentes leishmanicidas potentes. Sin embargo, la complejidad estructural de los correspondientes conjugados con CPPs necesaria para lograr actividad leishmanicida, suponía una clara limitación para un potencial uso como fármaco, lo que nos hizo plantearnos la necesidad de seguir evolucionando las estructuras anteriores hacia inhibidores no peptídicos basados en moléculas pequeñas con mejores propiedades *druglike*.

Por esta razón, el objetivo de esta Tesis Doctoral es la búsqueda de disruptores no peptídicos de la dimerización de *Li-TryR* con mejores propiedades como fármaco, y en particular, con una mejor permeabilidad celular que los peptidomiméticos antecesores. Para ello, nos centraremos en primer lugar en una de las estrategias más utilizadas en la búsqueda de miméticos estructurales de hélice α , que consiste en el diseño de peptidomiméticos Tipo III o clase C según las clasificaciones comentadas anteriormente (ver **Figura I19**).

I.2.2. Miméticos estructurales no peptídicos de hélice α : Proteomiméticos

El término *proteomimético* fue acuñado por Hamilton y colaboradores⁷⁸ en 2002 para referirse a un tipo de mimético estructural de hélice α , donde el esqueleto peptídico original se reemplaza por un esqueleto o molde orgánico (*scaffold*), capaz de disponer espacialmente las cadenas laterales de los residuos situados en las posiciones **i**, **i+3** (o **i+4**) e **i+7** de manera similar a las del péptido original. El fundamento de este diseño se basa en que en IPPs mediadas por hélices α , se ha observado que para péptidos cortos, con 2 o 3 vueltas de hélice, las cadenas laterales situadas en esas posiciones juegan un papel fundamental en la interacción con la proteína (**Figura I20**). Comparado con los péptidos, las moléculas pequeñas presentan importantes ventajas en términos de permeabilidad celular, estabilidad proteolítica y biodisponibilidad, por lo que no es de extrañar que esta estrategia haya sido ampliamente utilizada para IPPs.

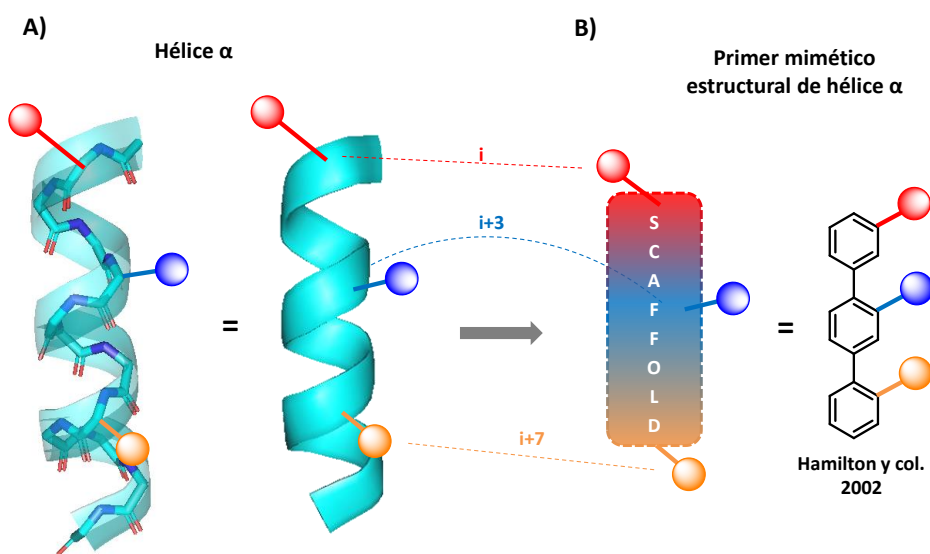


Figura I20. Miméticos estructurales de hélice α o *proteomiméticos*. **A)** Representación esquematizada de una hélice α . Las cadenas laterales de los residuos **i**, **i+3** e **i+7** se representan con esferas. **B)** Representación y estructura química del primer proteomimético basado en el *scaffold* de terfenilo.

El primer proteomimético descrito en 2002 fue el esqueleto o *scaffold* de terfenilo funcionalizado,^{78,79} propuesto como mimético no peptídico de hélice α y antagonista del factor anti-apoptótico Bcl-x_L. En dicho trabajo, se propuso el empleo de un *scaffold* basado en tres anillos aromáticos unidos directamente a través de enlaces Csp²-Csp² (terfenilo), como un ejemplo de estructura capaz de mimetizar la superficie de contacto de la hélice α en la que se conforman las proteínas pro-apoptóticas Bak- y Bad- para interactuar con el regulador Bcl-x_L. Estos terfenilos llegaron a presentar afinidades frente a Bcl-x_L en el rango nanomolar bajo.

No obstante, el esqueleto de terfenilo tiene varias limitaciones relacionadas con su dificultad sintética y su baja solubilidad en agua, lo que ha llevado al desarrollo posterior de nuevos esqueletos con mejores propiedades.⁸⁰⁻⁸²

Los proteomiméticos se pueden clasificar en tres categorías en función de la restricción responsable de la rigidez conformacional: estéricamente restringidos, estabilizados por enlace de hidrógeno intramolecular, o covalentemente restringidos (**Figura I21**):

1. Los esqueletos **estéricamente restringidos** basan su rigidez conformacional en la presencia de sustituyentes en posiciones espaciales próximas, que limitan la capacidad de rotación y favorecen la no-planaridad de la estructura. Los primeros proteomiméticos descritos basados en núcleos de terfenilo, pertenecen a este grupo y como se ha comentado anteriormente, presentan inconvenientes en cuanto a su síntesis y a la elevada hidrofobicidad del esqueleto que se traduce en una baja solubilidad acuosa. Esto ha llevado a desarrollar una segunda generación de proteomiméticos basados en esqueletos heterocíclicos de pirrolopirimidina⁸³, imidazol-fenil-tiazol⁸⁴, oxazol-pirrol-piperazina⁸⁵, o terpirimidinas⁸⁶ entre otros.

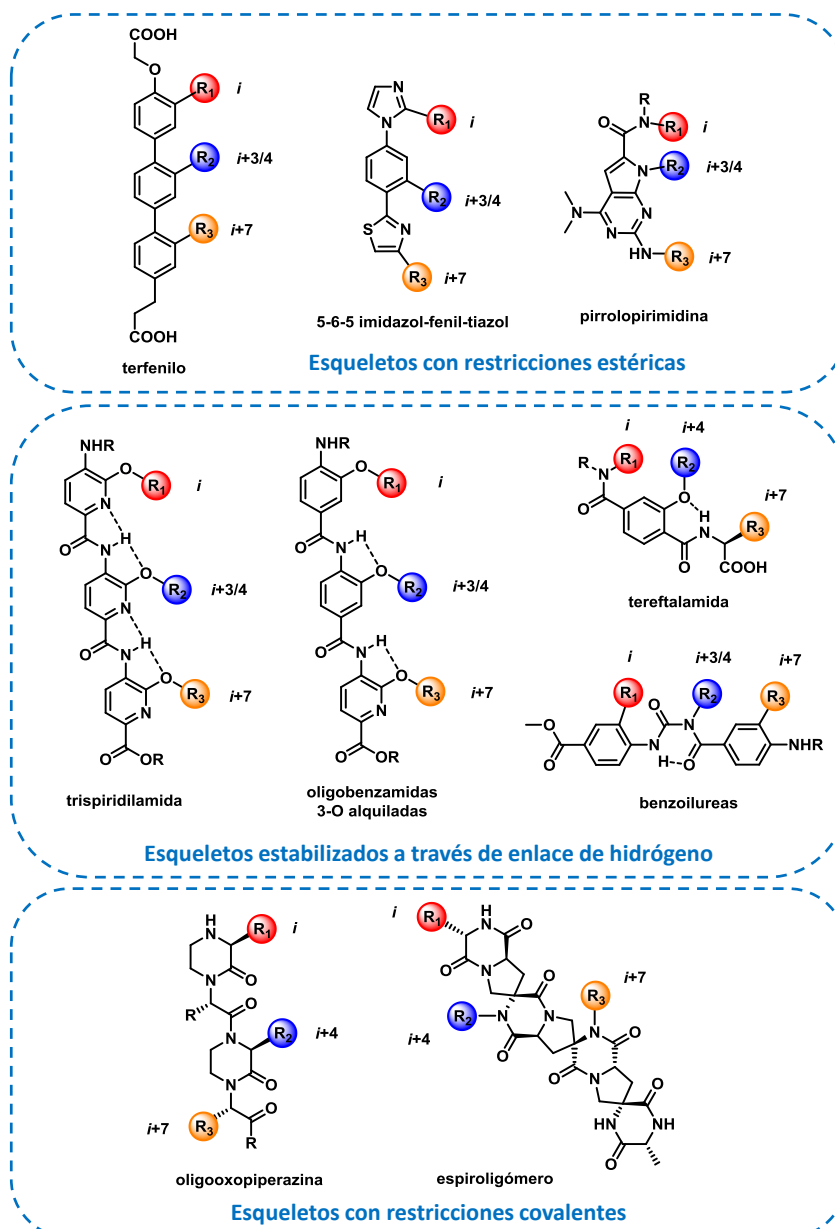


Figura 121. Estructuras químicas de algunos ejemplos representativos de miméticos estructurales de hélices α . Los sustituyentes coloreados están diseñados para mimetizar las cadenas laterales de las posiciones i , $i+3/4$, $i+7$.

2. Las oligobenzamidas surgieron como esqueletos fácilmente accesibles mediante síntesis secuencial en fase sólida, ofreciendo de esta manera la posibilidad de generar amplias librerías de compuestos con gran variedad estructural. Los **enlaces de hidrógeno intramoleculares** son la fuerza directora que les permite fijar la disposición espacial adecuada de los sustituyentes en la misma cara de la molécula. En casos como los derivados de trispíridilamida, la presencia de dos enlaces de hidrógeno en torno al enlace amida, genera una mayor curvatura de la estructura respecto a las oligobenzamidas 2-O alquiladas y 3-O alquiladas. En general se podría decir que gracias a su mayor flexibilidad, las oligoamidas han resultado ser inhibidores menos potentes de interacciones proteína-proteína en comparación con los *scaffold* de

terfenilo más rígidos. Los derivados de tereftalamida por su parte, conjugan la rigidez estructural con una buena solubilidad acuosa y una menor complejidad sintética en comparación con los terfenilos.⁸⁷ Por último, las benzoilureas son miméticos muy atractivos desde el punto de vista de su accesibilidad sintética al igual que otros ejemplos de este grupo, por la naturaleza modular de su síntesis que permite incorporar de forma sencilla y consecutiva sustituyentes adicionales en las posiciones i+10 ó i+11.

3. Los *scaffold* **covalentemente restringidos** de oligoioxopiperazinas⁸⁸ y espiroligómeros⁸⁹, sustituyen los anillos aromáticos de los proteomiméticos anteriores por un esqueleto quiral capaz de proporcionar un alineamiento estructural perfectamente definido que puede traducirse en especificidades de unión más elevadas debido a su menor flexibilidad.

Todos estos proteomiméticos están diseñados para mimetizar una cara de interacción de la hélice α . Sin embargo, cada vez se describen más ejemplos de IPPs mediadas a través de hélices donde participan aminoácidos presentes en distintas caras. De este modo, el desarrollo de *scaffolds* más complejos capaces de mimetizar dos caras de interacción, y con ello resultar potencialmente más selectivos sobre una determinada superficie de reconocimiento, supone un reto actual dentro del campo de los miméticos estructurales de hélice α .^{90,91}

A pesar del desafío que conlleva el desarrollo de moléculas pequeñas como estrategia en la búsqueda de inhibidores de IPPs, existen actualmente múltiples ejemplos en la bibliografía que demuestran su aplicabilidad con éxito en modelos intracelulares, lo cual evidencia la mejora en las propiedades farmacocinéticas que suponen con respecto a las estructuras peptídicas.^{83,92} Al primer ejemplo comentado anteriormente de los terfenilos como antagonistas de Bcl-X_L en células humanas⁷⁹, se podría sumar el diseño de pirrolopirimidinas como inhibidores duales de la interacción MDMX- y MDM2-p53⁸³, con actividad pro-apoptótica en células de cáncer de pulmón a través de la liberación del supresor tumoral p53. Las oligoamidas aromáticas N-alquiladas involucradas en el proceso de desestabilización del heterodímero p53-hDM2, son otro ejemplo de proteomiméticos capaces de inhibir selectivamente los moduladores hDM2 y Mcl-1 en modelos celulares *in vitro*, representando así una estrategia novedosa y prometedora en las terapias frente al cáncer.^{93,94}

Los progresos llevados a cabo en la última década en el campo de los miméticos estructurales de hélice α , tanto en el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas para acceder a amplias librerías de compuestos con una elevada diversidad estructural, como en la evolución de la capacidad de identificación y estudio de un extenso abanico de interacciones proteína-proteína⁶⁷, nos han llevado a elegir en esta Tesis Doctoral la aproximación de proteomiméticos como punto de partida para el diseño de disruptores no peptídicos de la dimerización de Li-TryR con actividad leishmanicida.

I.3. ESTRUCTURA DEL TRABAJO Y OBJETIVOS GENERALES

El trabajo descrito en la presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación iniciada hace más de 9 años en nuestro grupo, encaminada a la obtención de inhibidores potentes de la dimerización de la tripanotión reductasa de *Leishmania Infantum* (Li-TryR), como una estrategia novedosa para obtener agentes antileishmania más eficaces y selectivos.

A partir de los antecedentes descritos anteriormente, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la búsqueda de inhibidores no peptídicos de la dimerización de Li-TryR basados en moléculas heterocíclicas pequeñas, con el fin de evolucionar desde las estructuras peptídicas anteriores hacia disruptores de dimerización con mejores propiedades farmacocinéticas y de biodisponibilidad, que puedan dar lugar a compuestos con actividad leishmanicida y baja citotoxicidad que pudieran ser seleccionados como candidatos para ensayos *in vivo*.

Para abordar este objetivo, el trabajo se ha estructurado en tres capítulos:

Capítulo 1: Diseño, síntesis y evaluación biológica de una quimioteca de proteomiméticos basados en el esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol, sustituido con las cadenas laterales de los residuos clave propuestos para la interacción del péptido prototipo **P1** (Ac-PKIIQSVIGNleKNle-NH₂) con la enzima. La actividad biológica de estos compuestos en ensayos enzimáticos y en cultivo celular, se comparará con la del péptido prototipo **P1** y con los datos obtenidos de otra serie de proteomiméticos basados en un *scaffold* de pirrolopirimidina desarrollado en paralelo en nuestro grupo de investigación.

Capítulo 2: Diseño de dos nuevas series de compuestos basados en un esqueleto no descrito hasta la fecha de 5-6-5 triazol-fenil-tiazol (**Serie I**), y sus correspondientes sales de triazolío (**Serie II**) utilizando una estrategia de *scaffold hopping*. Asimismo, se realizará un estudio de las propiedades *druglike* y de fluorescencia tanto de las series del triazol como de los proteomiméticos de imidazol descritos en el primer capítulo. En cuanto a la actividad biológica, además del estudio del efecto disruptor de la dimerización de Li-TryR, se evaluará la actividad leishmanicida de estos compuestos frente a parásitos aislados, y en modelos de infección de macrófagos con amastigotes. Por último se realizarán experimentos para la determinación del mecanismo de acción de los compuestos frente al parásito.

Capítulo 3: Estudios para la determinación del mecanismo de inactivación de Li-TryR por parte de los compuestos y propuesta del modo de unión con la enzima de los compuestos más representativos de las series del **Capítulo 2**, empleando técnicas de cristalografía de Rayos-X y de modelado molecular. En base a los modelos de interacción propuestos se diseñarán nuevos ligandos planteándose finalmente la preparación de estructuras simétricas muy novedosas en una cavidad central de la interfaz de dimerización no explorada hasta el momento para

OBJETIVOS

ninguno de los inhibidores de TryR descritos y diferente de la región original del péptido prototipo.

COLABORACIONES

La evaluación biológica de todas las moléculas sintetizadas en esta Tesis Doctoral en ensayos enzimáticos de actividad y de dimerización, ensayos *in vitro* de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad, así como los estudios tanto del mecanismo de inhibición de *Li*-TryR como del mecanismo de acción de los compuestos frente a parásito, ha sido realizada por el grupo del Prof. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá.

Los estudios computacionales de exploración de la superficie proteica en busca de potenciales zonas para albergar ligandos, así como de los canales que dan acceso a cavidades enterradas en la proteína y estudios de *docking*, se han realizado en colaboración con el Prof. Federico Gago de la Universidad de Alcalá y con el Dr. Pedro Sánchez Murcia de la Universidad de Viena.

La determinación de las propiedades fluorescentes de los compuestos se ha realizado en colaboración con el grupo del Prof. Guillermo Orellana de la Universidad Complutense de Madrid.

Los estudios de cristalografía de rayos-X han sido realizados por el grupo del Prof. Juan Hermoso del Instituto de Química Física Rocasolano del CSIC (IQFR-CSIC).

I.4. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Organización Mundial de la Salud <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- (2) Silva-Jardim, I.; Thiemann, O. H.; Anibal, F. F. Leishmaniasis and chagas disease chemotherapy: A critical review. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (10), 1810–1823. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140229>.
- (3) Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; de Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. **2012**, *7* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>.
- (4) Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int. J. Infect. Dis.* **2011**, *15* (8). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>.
- (5) Strazzulla, A.; Cocuzza, S.; Pinzone, M. R.; Postorino, M. C.; Cosentino, S.; Serra, A.; Cacopardo, B.; Nunnari, G. Mucosal leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/805108>.
- (6) Esch, K. J.; Petersen, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26* (1), 58–85. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>.
- (7) Bates, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37* (10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>.
- (8) Mukhopadhyay, D.; Dalton, J. E.; Kaye, P. M.; Chatterjee, M. Post kala-azar dermal leishmaniasis: An unresolved mystery. *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.004>.
- (9) Cox, F. E. G. History of human parasitology. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15* (4), 595–612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>.
- (10) Alcolea, P. J.; Alonso, A.; Larraga, V. Rationale for selection of developmentally regulated genes as vaccine candidates against *Leishmania Infantum* infection. *Vaccine* **2016**, *34* (46), 5474–5478. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2016.08.081>.
- (11) Sundar, S.; Chakravarty, J.; Meena, L. P. Leishmaniasis: Treatment, drug resistance and emerging therapies. *Expert Opin. Orphan Drugs*. **2019**, *7* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/21678707.2019.1552853>.
- (12) No, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop.* **2016**, *155*, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.016>.
- (13) Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. K. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356* (25), 2571–2581. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066536>.
- (14) Dorlo, T. P. C.; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H.; de Vries, P. J. Miltefosine: A review of its

- pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, 67 (11), 2576–2597. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>.
- (15) Leroux, A. E.; Krauth-Siegel, R. L. Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2016**, 206 (1–2), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.11.003>.
- (16) Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2008**, 1780 (11), 1236–1248. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>.
- (17) Brun, R.; Blum, J.; Chappuis, F.; Burri, C. Human african trypanosomiasis. *Lancet.* **2010**, 375 (9709), 148–159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60829-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1).
- (18) Ivens, A. C. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science (80)*. **2005**, 309 (5733), 436–442. <https://doi.org/10.1126/science.1112680>.
- (19) Fairlamb, A. H.; Cerami, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, 46 (1), 695–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.003403>.
- (20) Fyfe, P. K.; Oza, S. L.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (25), 17672–17680. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801850200>.
- (21) Shames, S. L.; Fairlamb, A. H.; Cerami, A.; Walsh, C. T. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a new member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry.* **1986**, 25 (12), 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/bi00360a007>.
- (22) Tovar, J.; Wilkinson, S.; Mottram, J. C.; Fairlamb, A. H. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the TryA gene locus. *Mol. Microbiol.* **1998**, 29 (2), 653–660. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00968.x>.
- (23) Dumas, C. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* **1997**, 16 (10), 2590–2598. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2590>.
- (24) Krieger, S.; Schwarz, W.; Arlyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H.; Krauth-Siegel, R. L.; Clayton, C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **2000**, 35 (3), 542–552. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01721.x>.
- (25) Londoño, M. A. Diseño y evaluación de inhibidores peptídicos dirigidos a la interfaz de dimerización de la tripanotión reductasa. **2017**, Universidad de Alcalá.
- (26) Khan, M. O. F. Trypanothione reductase: A viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. *Drug Target Insights.* **2007**, 2 (2), 129–146. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1032037>.
- (27) Tiwari, N.; Tanwar, N.; Munde, M. Molecular insights into trypanothione reductase-inhibitor interaction: A structure-based review. *Arch. Pharm. (Weinheim).* **2018**, 351 (6),

- 1–12. <https://doi.org/10.1002/ardp.201700373>.
- (28) Bi, X.; Lopez, C.; Bacchi, C. J.; Rattendi, D.; Woster, P. M. Novel alkylpolyaminoguanidines and alkylpolyaminobiguanides with potent antitrypanosomal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (12), 3229–3232. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.03.048>.
- (29) Bernardes, L. S. C.; Zani, C. L.; Carvalho, I. Trypanosomatidae diseases: From the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20* (21), 2673–2696. <https://doi.org/10.2174/0929867311320210005>.
- (30) Faerman, C. H.; Savvides, S. N.; Strickland, C.; Breidenbach, M. A.; Ponasik, J. A.; Ganem, B.; Ripoll, D.; Krauth-Siegel, R. L.; Karplus, P. A. Charge is the major discriminating factor for glutathione reductase *versus* trypanothione reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* **1996**, *4* (8), 1247–53.
- (31) Fernandez-Gomez, R. 2-Amino diphenylsulfides as new inhibitors of trypanothione reductase. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **1995**, *6* (2), 111–118. [https://doi.org/10.1016/0924-8579\(95\)00029-X](https://doi.org/10.1016/0924-8579(95)00029-X).
- (32) Parveen, S.; Khan, M. O. F.; Austin, S. E.; Croft, S. L.; Yardley, V.; Rock, P.; Douglas, K. T. Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (25), 8087–8097. <https://doi.org/10.1021/jm050819t>.
- (33) Zani, C. L.; Fairlamb, A. H. 8-Methoxy-naphtho[2,3-*b*]thiophen-4,9-quinone, a non-competitive inhibitor of trypanothione reductase. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2003**, *98* (4), 565–568. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400026>.
- (34) Cenas, N.; Bironaite, D.; Dickancaite, E.; Anusevicius, Z.; Sarlauskas, J.; Blanchard, J. S. Chinifur, a selective inhibitor and "Subversive Substrate" for *Trypanosoma congolense* trypanothione reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204* (1), 224–229. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2448>.
- (35) Maya, J. D.; Bollo, S.; Nuñez-Vergara, L. J.; Squella, J. A.; Repetto, Y.; Morello, A.; Périé, J.; Chauvière, G. *Trypanosoma cruzi*: Effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65* (6), 999–1006. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01663-5](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01663-5)
- (36) Bonse, S.; Richards, J. M.; Ross, S. A.; Lowe, G.; Krauth-Siegel, R. L. (2,2':6',2''-Terpyridine)platinum(II) complexes are irreversible inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase but not of human glutathione reductase. **2000**. <https://doi.org/10.1021/JM000219O>.
- (37) Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J. D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R. L. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (11), 3322–3331. <https://doi.org/10.1021/jm0512241>.

- (38) Ilari, A.; Baiocco, P.; Messori, L.; Fiorillo, A.; Boffi, A.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T.; Colotti, G. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: The X-Ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids*. **2012**, *42* (2–3), 803–811. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0997-9>.
- (39) Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H.; Schirmer, R. H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (5), 690–715. <https://doi.org/10.1002/anie.200300639>.
- (40) Lu, J.; Vodnala, S. K.; Gustavsson, A. L.; Gustafsson, T. N.; Sjöberg, B.; Johansson, H. A.; Kumar, S.; Tjernberg, A.; Engman, L.; Rottenberg, M. E.; et al. Ebsulfur is a benzisothiazolone cytotoxic inhibitor targeting the trypanothione reductase of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (38), 27456–27468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495101>.
- (41) Lee, B.; Bauer, H.; Melchers, J.; Ruppert, T.; Rattray, L.; Yardley, V.; Davioud-Charvet, E.; Krauth-Siegel, R. L. Irreversible inactivation of trypanothione reductase by unsaturated mannich bases: A divinyl ketone as key intermediate. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (23), 7400–7410. <https://doi.org/10.1021/jm0504860>.
- (42) Cunningham, M. L.; Zvelebil, M. J.; Fairlamb, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *221* (1), 285–295.
- (43) Jacoby, E. M.; Schlichting, I.; Lantwin, C. B.; Kabsch, W.; Krauth-Siegel, R. L. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase - mepacrine complex. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1996**, *24* (1), 73–80. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199601\)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P).
- (44) Saravanamuthu, A.; Vickers, T. J.; Bond, C. S.; Peterson, M. R.; Hunter, W. N.; Fairlamb, A. H. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (28), 29493–29500. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403187200>.
- (45) Girault, S.; Davioud-Charvet, E.; Maes, L.; Dubremetz, J.-F.; Debreu, M.-A.; Landry, V.; Sergheraert, C. Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: Bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (4), 837–846. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00312-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00312-6).
- (46) Baiocco, P.; Poce, G.; Alfonso, S.; Coccozza, M.; Porretta, G. C.; Colotti, G.; Biava, M.; Moraca, F.; Botta, M.; Yardley, V. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: A comparative analysis with its physiological substrate by X-Ray crystallography. *ChemMedChem*. **2013**, *8* (7), 1175–1183. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300176>.
- (47) Holloway, G. A.; Charman, W. N.; Fairlamb, A. H.; Brun, R.; Kaiser, M.; Kostewicz, E.; Novello, P. M.; Parisot, J. P.; Richardson, J.; Street, I. P. Trypanothione reductase high-throughput screening campaign identifies novel classes of inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (7), 2824–2833. <https://doi.org/10.1128/AAC.01568-08>.

- (48) Patterson, S.; Alpey, M. S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Street, I. P.; Frearson, J. A.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.; Fairlamb, A. H. Dihydroquinazolines as a novel class of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase inhibitors: Discovery, synthesis, and characterization of their binding mode by protein crystallography. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (19), 6514–6530. <https://doi.org/10.1021/jm200312v>.
- (49) Henderson, G. B.; Fairlamb, A. H.; Ulrich, P.; Cerami, A. Substrate specificity of the flavoprotein trypanothione disulfide reductase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry.* **1987**, *26* (11), 3023–3027. <https://doi.org/10.1021/bi00385a011>.
- (50) Patterson, S.; Jones, D. C.; Shanks, E. J.; Frearson, J. A.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G.; Fairlamb, A. H. Synthesis and evaluation of 1-(1-(benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem.* **2009**, *4* (8), 1341–1353. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900098>.
- (51) Eberle, C.; Lauber, B. S.; Fankhauser, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. Improved inhibitors of trypanothione reductase by combination of motifs: Synthesis, inhibitory potency, binding mode and antiprotozoal activities. *ChemMedChem.* **2011**, *6* (2), 292–301. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000420>.
- (52) Persch, E.; Bryson, S.; Todoroff, N. K.; Eberle, C.; Thelemann, J.; Dirdjaja, N.; Kaiser, M.; Weber, M.; Derbani, H.; Brun, R.; et al. Binding to large enzyme pockets: Small-molecule inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem.* **2014**, 1880–1891. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402032>.
- (53) De Gasparo, R.; Brodbeck-Persch, E.; Bryson, S.; Hentzen, N. B.; Kaiser, M.; Pai, E. F.; Krauth-Siegel, R. L.; Diederich, F. Biological evaluation and X-Ray co-crystal structures of cyclohexylpyrrolidine ligands for trypanothione reductase, an enzyme from the redox metabolism of *Trypanosoma*. *ChemMedChem.* **2018**, *13* (9), 957–967. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800067>.
- (54) Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing toward the reality. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (9), 1102–1114. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.001>.
- (55) Ran, X.; Gestwicki, J. E. Inhibitors of protein-protein interactions (PPIs): An analysis of scaffold choices and buried surface area. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *44*, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.06.004>.
- (56) King, A. C.; Peterson, T. J.; Horvat, T. Z.; Rodriguez, M.; Tang, L. A. Venetoclax: A first-in-class oral Bcl-2 inhibitor for the management of lymphoid malignancies. *Ann. Pharmacother.* **2017**, *51* (5), 410–416. <https://doi.org/10.1177/1060028016685803>.
- (57) McClements, W.; Yamanaka, G.; Garsky, V.; Perry, H.; Bacchetti, S.; Colonna, R.; Stein, R. B. Oligopeptides inhibit the ribonucleotide reductase of herpes simplex virus by causing subunit separation. *Virology.* **1988**, *162* (1), 270–273. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90421-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90421-7).
- (58) Feldhaus, P.; Frohlich, T.; Goody, R. S.; Isakov, M.; Schirmer, R. H. Synthetic inhibitors of adenylate kinases in the assays for ATPases and phosphokinases. *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57* (1), 197–204. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb02291.x>.

- (59) Lv, Z.; Chu, Y.; Wang, Y. HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity. *HIV. AIDS. (Auckl)*. **2015**, *7*, 95–104. <https://doi.org/10.2147/HIV.S79956>.
- (60) Sluis-Cremer, N.; Hamamouch, N.; San-Félix, A.; Velázquez, S.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. Structure–activity relationships of [2',5'-bis-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-β-d-ribofuranosyl]-3'-spiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxathiole-2',2'-dioxide)thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4834–4841. <https://doi.org/10.1021/JM0604575>.
- (61) Wachsmuth, L. M.; Johnson, M. G.; Gavenonis, J. Essential multimeric enzymes in kinetoplastid parasites: A host of potentially druggable protein-protein interactions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11* (6), e0005720. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005720>.
- (62) Toro, M. A.; Sánchez-Murcia, P. A.; Moreno, D.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Alzate, J. F.; Negri, A.; Camarasa, M. J.; Gago, F.; Velázquez, S.; Jiménez-Ruiz, A. Probing the dimerization interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with site-directed mutagenesis and short peptides. *ChemBioChem*. **2013**, *14* (10), 1212–1217. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200744>.
- (63) Robertson, N.; Spring, D. Using peptidomimetics and constrained peptides as valuable tools for inhibiting protein–protein interactions. *Molecules*. **2018**, *23* (4), 959. <https://doi.org/10.3390/molecules23040959>.
- (64) Jochim, A. L.; Arora, P. S. Systematic analysis of helical protein interfaces reveals targets for synthetic inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (10), 919–923. <https://doi.org/10.1021/cb1001747>.
- (65) Raj, M.; Bullock, B. N.; Arora, P. S. Plucking the high hanging fruit: A systematic approach for targeting protein–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (14), 4051–4057. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.11.023>.
- (66) Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. Modulators of protein–protein interactions. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (9), 4695–4748. <https://doi.org/10.1021/cr400698c>.
- (67) Wilson, A. J. Helix mimetics: recent developments. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2015**, *119* (1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.05.001>.
- (68) Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. Inhibition of α-helix-mediated protein–protein interactions using designed molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (3), 161–173. <https://doi.org/10.1038/nchem.1568>.
- (69) Pelay-Gimeno, M.; Glas, A.; Koch, O.; Grossmann, T. N. Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: mimicking peptide binding epitopes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (31), 8896–8927. <https://doi.org/10.1002/anie.201412070>.
- (70) Perez, J. J. Designing peptidomimetics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18* (7), 566–590. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180522075258>.

- (71) Ruiz-Santaquiteria, M.; Sánchez-Murcia, P. A.; Toro, M. A.; de Lucio, H.; Gutiérrez, K. J.; de Castro, S.; Carneiro, F. A. C.; Gago, F.; Jiménez-Ruiz, A.; Camarasa, M. J. First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent *in vitro* antileishmanial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *135*, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.020>.
- (72) Ruiz-Santaquiteria, M.; de Castro, S.; Toro, M. A.; de Lucio, H.; Gutiérrez, K. J.; Sánchez-Murcia, P. A.; Jiménez, M. Á.; Gago, F.; Jiménez-Ruiz, A.; Camarasa, M. J. Trypanothione reductase inhibition and anti-leishmanial activity of all-hydrocarbon stapled α -helical peptides with improved proteolytic stability. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *149*, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.071>.
- (73) Sánchez-Murcia, P. A.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Toro, M. A.; De Lucio, H.; Jiménez, M. Á.; Gago, F.; Jiménez-Ruiz, A.; Camarasa, M. J.; Velázquez, S. Comparison of hydrocarbon- and lactam-bridged cyclic peptides as dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* Trypanothione reductase. *RSC Adv.* **2015**, *5* (69), 55784–55794. <https://doi.org/10.1039/c5ra06853c>.
- (74) Chang, Y. S.; Graves, B.; Guerlavais, V.; Tovar, C.; Packman, K.; To, K.H.; Olson, K. A.; Kesavan, K.; Gangurde, P.; Mukherjee, A. Stapled α -helical peptide drug development: A potent dual inhibitor of MDM2 and MDMX for P53-dependent cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (36), E3445–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303002110>.
- (75) de Lucio, H.; Gamo, A. M.; Ruiz-Santaquiteria, M.; de Castro, S.; Sánchez-Murcia, P. A.; Toro, M. A.; Gutiérrez, K. J.; Gago, F.; Jiménez-Ruiz, A.; Camarasa, M. J. Improved proteolytic stability and potent activity against *Leishmania infantum* trypanothione reductase of α/β -peptide foldamers conjugated to cell-penetrating peptides. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *140*, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.032>.
- (76) Cheng, R. P.; Gellman, S. H.; DeGrado, W. F. β -peptides: From structure to function. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (10), 3219–3232. <https://doi.org/10.1021/cr000045i>.
- (77) Horne, W. S.; Boersma, M. D.; Windsor, M. A.; Gellman, S. H. Sequence-based design of α/β -peptide foldamers that mimic BH3 domains. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (15), 2853–2856. <https://doi.org/10.1002/anie.200705315>.
- (78) Kutzki, O.; Park, H. S.; Ernst, J. T.; Orner, B. P.; Yin, H.; Hamilton, A. D. Development of a potent Bcl-XL antagonist based on α -helix mimicry. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (40), 11838–11839. <https://doi.org/10.1021/ja026861k>.
- (79) Yin, H.; Lee, G. I.; Sedey, K. A.; Kutzki, O.; Park, H. S.; Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Wang, H. G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Terphenyl-based Bak BH3 α -helical proteomimetics as low-molecular-weight antagonists of Bcl-XL. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (29), 10191–10196. <https://doi.org/10.1021/ja050122x>.
- (80) Moon, H.; Lim, H.S. Synthesis and screening of small-molecule α -helix mimetic libraries targeting protein–protein interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *24*, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.10.023>.

- (81) Davis, J. M.; Tsou, L. K.; Hamilton, A. D. Synthetic non-peptide mimetics of α -helices. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 326–334. <https://doi.org/10.1039/b608043j>.
- (82) Bursavich, M. G.; Rich, D. H. Designing non-peptide peptidomimetics in the 21st century: Inhibitors targeting conformational ensembles. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (3), 541–558. <https://doi.org/10.1021/jm010425b>.
- (83) Lee, J. H.; Zhang, Q.; Jo, S.; Chai, S. C.; Oh, M.; Im, W.; Lu, H.; Lim, H. S. Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: Cell-permeable inhibitors of protein-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (4), 676–679. <https://doi.org/10.1021/ja108230s>.
- (84) Cummings, C. G.; Ross, N. T.; Katt, W. P.; Hamilton, A. D. Synthesis and biological evaluation of a 5-6-5 imidazole-phenyl-thiazole based α -helix mimetic. *Org. Lett.* **2009**, *11* (1), 25–28. <https://doi.org/10.1021/ol8022962>.
- (85) Moisan, L.; Odermatt, S.; Gombosuren, N.; Carella, A.; Rebek, J. Synthesis of an oxazole-pyrrole-piperazine scaffold as an α -helix mimetic. *European J. Org. Chem.* **2008**, *10*, 1673–1676. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200701164>.
- (86) Anderson, L.; Zhou, M.; Sharma, V.; McLaughlin, J. M.; Santiago, D. N.; Fronczek, F. R.; Guida, W. C.; McLaughlin, M. L. Facile iterative synthesis of 2,5-terpyrimidinylenes as nonpeptidic α -helical mimics. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (12), 4288–4291. <https://doi.org/10.1021/jo100272d>.
- (87) Yin, H.; Hamilton, A. D. Terephthalamide derivatives as mimetics of the helical region of Bak peptide target Bcl-XL protein. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (6), 1375–1379. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.09.096>.
- (88) Tošovská, P.; Arora, P. S. Oligooxopiperazines as nonpeptidic α -helix mimetics. *Org. Lett.* **2010**, *12* (7), 1588–1591. <https://doi.org/10.1021/ol1003143>.
- (89) C. E. Schfmeister, Z. Z. Brown, S. G. Shape-programmable macromolecules. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10).
- (90) Jayatunga, M. K. P.; Thompson, S.; Hamilton, A. D. α -Helix mimetics: Outwards and upwards. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (3), 717–724. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2013.12.003>.
- (91) Lanning, M. E.; Wilder, P. T.; Bailey, H.; Drennen, B.; Cavalier, M.; Chen, L.; Yap, J. L.; Raje, M.; Fletcher, S. Towards more druglike proteomimetics: Two-faced, synthetic α -helix mimetics based on a purine scaffold. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (32), 8642–8646. <https://doi.org/10.1039/C5OB00478K>.
- (92) Burslem, G. M.; Kyle, H. F.; Breeze, A. L.; Edwards, T. A.; Nelson, A.; Warriner, S. L.; Wilson, A. J. Small-molecule proteomimetic inhibitors of the HIF-1 α -P300 protein-protein interaction. *ChemBioChem.* **2014**, *15* (8), 1083–1087. <https://doi.org/10.1002/cbic.201400009>.
- (93) Plante, J. P.; Burnley, T.; Malkova, B.; Webb, M. E.; Warriner, S. L.; Edwards, T. A.; Wilson, A. J. Oligobenzamide proteomimetic inhibitors of the P53-HDM2 protein-protein interaction. *Chem. Commun.* **2009**, *34*, 5091–5093. <https://doi.org/10.1039/b908207g>.

- (94) Barnard, A.; Long, K.; Martin, H. L.; Miles, J. A.; Edwards, T. A.; Tomlinson, D. C.; Macdonald, A.; Wilson, A. J. Selective and potent proteomimetic inhibitors of intracellular protein-protein interactions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54* (10), 2960–2965. <https://doi.org/10.1002/anie.201410810>.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1: PROTEOMIMÉTICOS BASADOS EN EL ESQUELETO DE 5-6-5 IMIDAZOL-FENIL-TIAZOL

En este capítulo se pretende aplicar la aproximación de proteomiméticos¹ descrita anteriormente, como estrategia para la obtención de miméticos estructurales de hélice α de carácter no peptídico, que puedan resultar disruptores potentes del proceso de dimerización y de la actividad de la *Li-TryR*, y que presenten mejores propiedades como fármaco que los péptidos y peptidomiméticos antecesores.

El empleo de esta aproximación, implica en primer lugar la identificación de los residuos del péptido que resultan fundamentales para la interacción con la proteína diana, y en segundo lugar, la elección de un esqueleto o *scaffold* central capaz de disponer espacialmente las cadenas laterales de esos residuos clave propuestos de la misma forma que lo hace el esqueleto peptídico original.

1.1. Diseño de los proteomiméticos

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de la importancia de los residuos del péptido prototipo **P1** para la interacción con el monómero de *Li-TryR*.

1.1.1. Elección de los residuos clave del péptido **P1** para la actividad

En trabajos previos a esta tesis doctoral, se realizaron estudios teóricos tanto para la determinación de las contribuciones energéticas de cada residuo del péptido **P1** (Ac-PKIIQSVGISNleKNle-NH₂) a la energía libre de interacción con *Li-TryR*, así como un análisis pormenorizado de las contribuciones hidrófobas y electrostáticas de la región de la interfaz de dimerización donde se postula la interacción del péptido.²

Para la caracterización de la naturaleza de la interfaz de dimerización, se empleó el programa cGRILL³ desarrollado por el Laboratorio del Prof. Federico Gago (UAH), que permite muestrear una región enzimática concreta empleando sondas de distinta naturaleza, con el fin de caracterizar las superficies enzimáticas, y con ello las posibles interacciones. Estos resultados revelaron el gran peso que tiene un amplio hueco hidrófobo constituido por los residuos Val441', Phe454' y Leu468', donde interacciona el residuo de **Ile** del péptido prototipo **P1** (**Figura 1.1**).

Además, la evaluación biológica de una serie de péptidos truncados desde la posición N-terminal⁴, permitió confirmar la importancia de dicho aminoácido (**Ile9**) puesto que el péptido truncado Ac-PKIIQSVGI-NH₂, representó la mínima longitud necesaria para mantener la actividad enzimática.

Paralelamente, se realizó un *scanning de alanina*⁴ donde se procedió a la síntesis y evaluación biológica de una serie de péptidos lineales donde se reemplazó sistemáticamente cada uno de los aminoácidos del péptido, por un residuo de alanina. Los resultados de este

trabajo resaltaron, especialmente, la importancia de los sustituyentes de lisina (**Lys2**) y glutamina (**Gln5**) del péptido **P1** para la inhibición, dado que su sustitución por alanina en la secuencia original del péptido tuvo como consecuencia una pérdida total o significativa de la afinidad del mismo por el monómero.

En conjunto los resultados computacionales y experimentales anteriores, pusieron de manifiesto la importancia de los residuos de **Lys**, **Gln**, e **Ile** para la interacción del péptido con la enzima. Por ese motivo se consideró a dichos residuos situados en las posiciones **i**, **i+3** e **i+7** de la hélice, en la misma cara de interacción (**Figura 1.1A**), como los residuos clave del péptido **P1** para la interacción con *Li*-TryR.

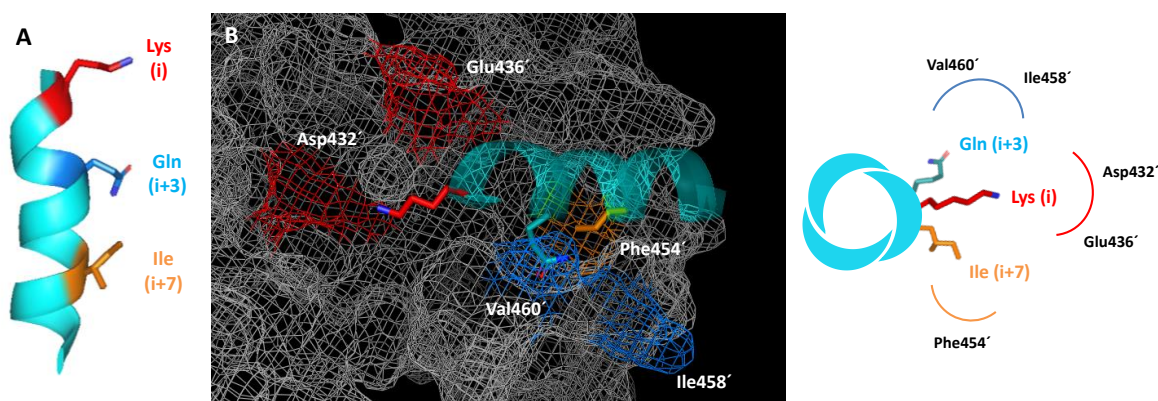


Figura 1.1. A) Residuos clave del péptido **P1** propuestos para la interacción con *Li*-TryR; B) Propuesta de interacción entre el péptido de referencia **P1** y el monómero de *Li*-TryR.

Estudios de *docking* nos llevaron a proponer el modelo de interacción del péptido **P1** en la interfaz de dimerización² mostrado en la **Figura 1.1B**, donde se detallan las interacciones clave responsables de la afinidad del péptido por la diana: una interacción electrostática entre la **Lys2** y los residuos de Asp432' y Glu436', un enlace de hidrógeno entre la cadena lateral de la **Gln5** y el esqueleto peptídico de los residuos de Val460' e Ile458', y finalmente interacciones hidrofóbicas de la cadena lateral de **Ile9** en la región hidrófoba definida por el residuo de Phe454'.

Una vez seleccionados los aminoácidos clave del péptido prototipo, el siguiente paso consistió en la elección del *scaffold* orgánico teniendo en cuenta como criterios de selección su viabilidad sintética de cara a su funcionalización con las cadenas laterales de nuestros residuos propuestos, así como las buenas propiedades fisicoquímicas del mismo y su demostrado funcionamiento biológico como proteomimético.

1.1.2. Elección del esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol

Entre la amplia variedad de moldes o *scaffolds* descritos como miméticos estructurales de hélice α , y concretamente dentro de aquellos que utilizan restricciones estéricas para la pre-organización espacial de los sustituyentes, seleccionamos el esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-

tiazol descrito por Hamilton y colaboradores,⁵ proponiéndose el proteomimético **1.1** que se muestra en la **Figura 1.2**. La síntesis de este tipo de estructuras permitiría *a priori* la introducción de las cadenas laterales de nuestros residuos clave de forma rápida, eficiente y modular, a partir de reactivos comerciales. Además, este proteomimético ofrece la ventaja de tener una mayor solubilidad acuosa en comparación con los primeros proteomiméticos de terfenilo⁶, al estar constituido por anillos heterocíclicos como el imidazol o el 1,3-tiazol. La aplicación de este scaffold a IPPs ha dado lugar a buenos resultados por ejemplo para la inhibición de las IPPs entre la fosfatasa CdC42 y el factor de regulación Dbs.⁵

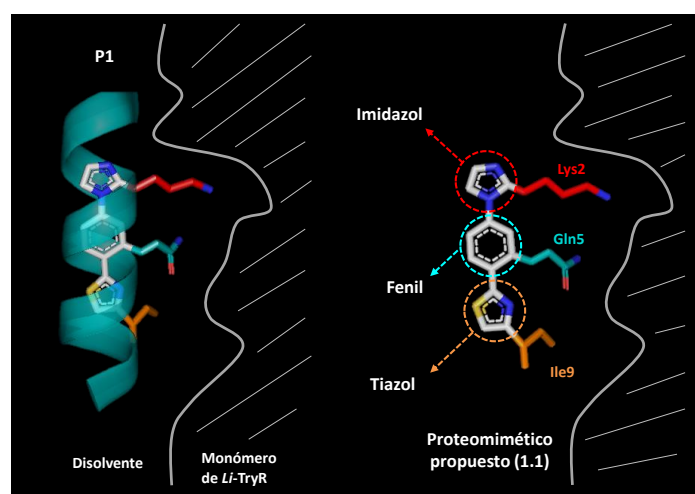
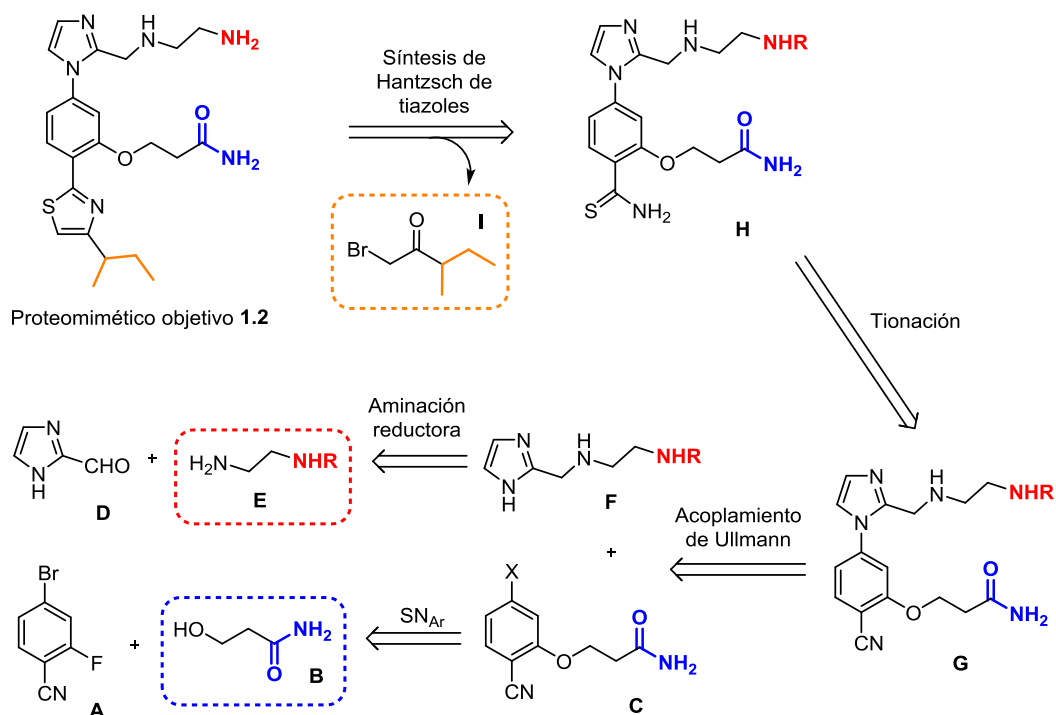


Figura 1.2. Proteomimético propuesto **1.1** basado en un esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol.

La naturaleza anfifílica de estos derivados favorecería la exposición del *scaffold* hacia el disolvente, orientando teóricamente los sustituyentes hacia el dominio de dimerización del monómero de *Li-TryR* (**Figura 1.2**).

1.2. Síntesis del proteomimético objetivo 1.2

Una vez diseñado el proteomimético de imidazol-fenil-tiazol (**Figura 1.3**), que incorpora los sustituyentes que mimetizan las cadenas laterales de los residuos de **Lys**, **Gln** e **Ile**, en primer lugar se propusieron algunas variaciones en las cadenas laterales atendiendo a las posibilidades sintéticas que ofrece el esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol, con el fin de adecuar la síntesis a la disponibilidad comercial o a la accesibilidad sintética de los productos de partida. De esta manera, se propuso la obtención del proteomimético objetivo **1.2** cuya propuesta sintética se halla recogida en el siguiente esquema retrosintético (**Esquema 1.1**).



Esquema 1.1. Diseño del proteomimético objetivo **1.2** y su análisis retrosintético, destacándose los reactivos que incorporan los sustituyentes que mimetizan los residuos clave.

Así, la síntesis comenzaría con la introducción en el anillo central del sustituyente que mimetiza el residuo de **Gln** (**C**). Para ello se propuso una reacción de sustitución nucleófila aromática (SN_{Ar}) entre el 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo (**A**) y el alcohol portador de dicha cadena lateral (**B**).

Por otro lado la preparación del anillo de imidazol que incorpora la cadena lateral que mimetiza el residuo de **Lys** (**F**), se llevaría a cabo mediante una reacción de aminación reductora entre el aldehído (**D**) y la etilendiamina monoprottegida (**E**). Posteriormente, el imidazol funcionalizado (**F**) se acoplaría con el anillo central convenientemente funcionalizado (**C**) mediante una reacción de acoplamiento C-N de tipo Ullmann para dar el intermedio (**G**).

Finalmente, se llevaría a cabo la generación del anillo de tiazol sustituido con la cadena lateral mimética de **Ile**, mediante una síntesis clásica de Hantzsch entre la tioamida (**H**), sintetizada a través de una reacción de tionación a partir de (**G**), y el α -halocarbonilo (**I**) sustituido adecuadamente.

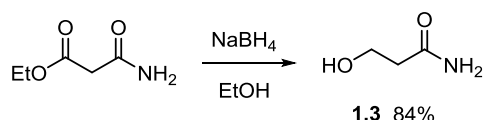
A continuación se detalla la síntesis del proteomimético objetivo **1.2** que consta de los siguientes pasos clave:

1.2.1. Reacción de Sustitución Nucleófila Aromática (SN_{Ar})

De acuerdo con el análisis retrosintético anterior, el primer paso para la obtención del compuesto objetivo **1.2** consistió en una reacción de sustitución nucleófila aromática (SN_{Ar})

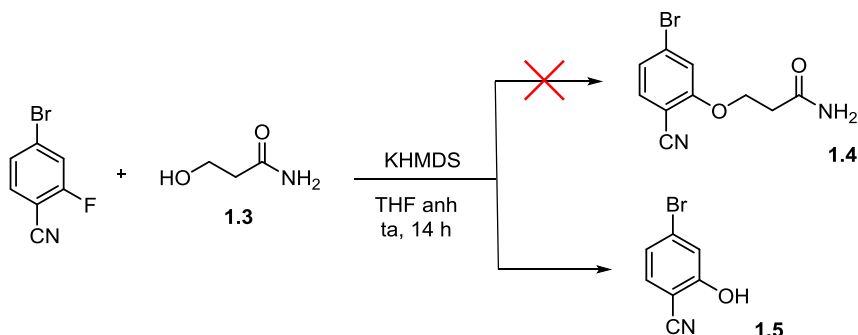
entre el 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo comercial y la 3-hidroxiopropanamida **1.3** previamente sintetizada, con el fin de decorar el núcleo central del *scaffold* con el sustituyente que mimetiza la cadena lateral de **Gln**.

De este modo, el tratamiento de la monoamida de malonato de etilo con NaBH_4 en EtOH a temperatura ambiente⁷, condujo al alcohol lineal deseado **1.3** en un 84% de rendimiento tras purificación cromatográfica (**Esquema 1.2**).



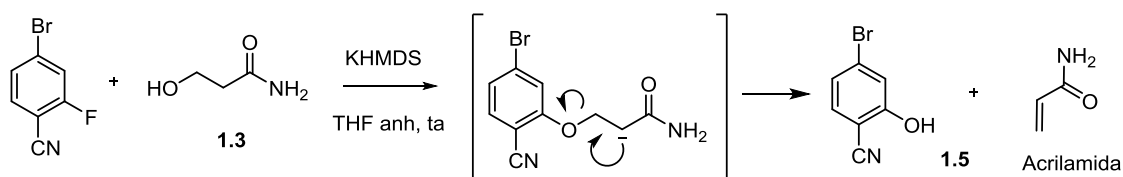
Esquema 1.2. Síntesis de la 3-hidroxiopropanamida **1.3** no comercial.

Seguidamente, se intentó llevar a cabo la reacción de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ entre el 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo comercial y el alcohol lineal **1.3**. El empleo de dicho haluro de arilo permitiría, en principio, la sustitución selectiva del -F frente al -Br por tratarse de un mejor grupo saliente y estar en posición *-orto* respecto del grupo electroattractor -CN. Sin embargo, los intentos iniciales de reacción en presencia de una base fuerte como la bis-trimetilsililamida de potasio (KHMDs) siguiendo las condiciones descritas por Hamilton y colaboradores,⁵ no condujeron al producto deseado **1.4**, detectándose en su lugar la formación del compuesto fenólico **1.5** (**Esquema 1.3**).



Esquema 1.3. $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ entre el 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo y el alcohol lineal **1.3** empleando KHMDs.

La formación de este producto **1.5** podría explicarse mediante la abstracción del protón en alfa al carbonilo, seguido de la eliminación intramolecular de la cadena lateral en forma de acrilamida (**Esquema 1.4**).

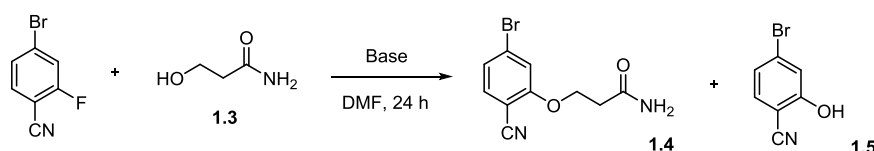


Esquema 1.4. Proceso de eliminación propuesto para explicar la formación del producto **1.5** en presencia de KHMDs.

La inestabilidad en medio básico de este tipo de éteres aromáticos, con facilidad para eliminar la cadena lateral y evolucionar hacia el derivado de fenol, ha sido descrita^{8,9} e incluso empleada como una estrategia de protección/desprotección de alcoholes fenólicos a través de sus correspondientes éteres homoalílicos.¹⁰

Con el fin de obtener el compuesto deseado **1.4**, se llevó a cabo un estudio de optimización de la reacción de S_NAr donde se modificó la naturaleza y el número de equivalentes de base, la temperatura e incluso se estudió el empleo de radiación de microondas (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Estudio de optimización de la reacción de S_NAr entre el 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo y el alcohol **1.3** en DMF al cabo de 24 horas.



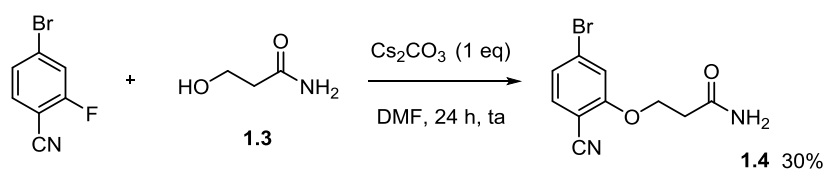
Entrada	Base	nº equiv base	T (°C)	Conversión ^a (%)	Rdto 1.4 ^a (%)	Rdto 1.5 ^a (%)	Proporción 1.4 / 1.5
1	K ₂ CO ₃	3	80	47	23	13	1.8 / 1
2	K ₂ CO ₃	3	70	45	21	9	2.3 / 1
3	K ₂ CO ₃	3	60	32	25	7	3.6 / 1
4	K ₂ CO ₃	4	60	29	22	7	3.1 / 1
5 ^b	K ₂ CO ₃	3	MW	17	10	1	10 / 1
6	Cs ₂ CO ₃	3	60	75	8	59	1 / 7.4
7	Cs ₂ CO ₃	3	ta	55	31	25	1.2 / 1
8	Cs ₂ CO ₃	1	ta	47	34	14	2.5 / 1

^a Conversión y rendimientos estimados por HPLC; ^b Reactor de microondas, 3 h a 60 °C.

El empleo de una base más débil que KHMDS ($pK_a = 26$) como K₂CO₃ ($pK_a = 10$) a 80 °C en DMF siguiendo condiciones descritas¹¹ (**entrada 1**), dio lugar a la formación del compuesto deseado **1.4**, junto con el producto de eliminación **1.5** en una proporción de 1.8/1 y con una conversión próxima al 50%. Ni la disminución de la temperatura (**entradas 2 y 3**), ni el aumento del número de equivalentes de base (**entrada 4**), lograron mejorar el rendimiento del producto deseado a pesar de la mejora de la selectividad, todo ello debido a las bajas conversiones que se obtuvieron. Con el fin de aumentar la conversión, llevamos a cabo la reacción utilizando radiación de microondas, lográndose en estas condiciones las mejores selectividades hasta ese momento, pero sin que ello se tradujese nuevamente en un aumento

en la conversión (**entrada 5**). El empleo de una base ligeramente más fuerte que el K_2CO_3 como es el Cs_2CO_3 ($pK_a = 12$), permite mantener un cierto margen respecto a la acidez que presentan los protones en alfa al carbonilo, y cuya abstracción inicia el proceso de eliminación del producto **1.4** hacia el fenol indeseado **1.5**. Así, el tratamiento de 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo y el alcohol **1.3** con Cs_2CO_3 (3 eq) a 60 °C, condujo a las mejores conversiones logradas hasta el momento (75%), sin embargo originó una mayor proporción del producto de eliminación **1.5** (**entrada 6**). La disminución de la temperatura hasta temperatura ambiente (**entrada 7**), y el empleo de un número menor de equivalentes de Cs_2CO_3 (**entrada 8**), permitieron minimizar la formación de **1.5** manteniéndose conversiones moderadas próximas al 50%. Por tanto, a la vista de los resultados mostrados en la **Tabla 1.1** las mejores condiciones de reacción consistieron en el empleo de 1 equivalente de Cs_2CO_3 a temperatura ambiente, obteniéndose un 34% de rendimiento (calculado por HPLC) del producto deseado.

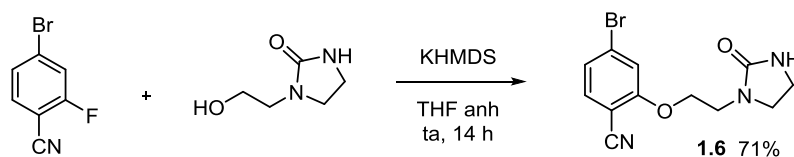
De esta manera, se llevó a cabo la reacción en las condiciones óptimas determinadas, lo que permitió aislar el producto deseado **1.4** en un 30% de rendimiento tras purificación cromatográfica (**Esquema 1.5**).



Esquema 1.5. Reacción de SN_{Ar} en presencia de Cs_2CO_3 .

El bajo rendimiento obtenido para esta primera etapa de la síntesis, junto con los problemas de estabilidad en medio básico mostrados por el compuesto **1.4**, nos llevaron a plantear la preparación de un bioisómero del grupo amida (capaz de mimetizar las interacciones del residuo de **Gln**), que presentase una mayor estabilidad química.

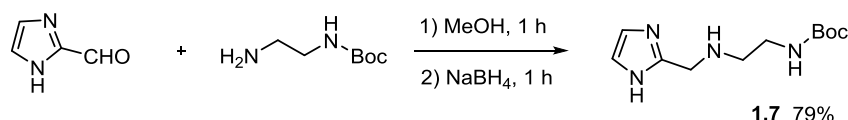
Dentro de los distintos bioisómeros de amida descritos^{12,13}, escogimos la urea cíclica 1-(2-hidroxiethyl)imidazolidin-2-ona con la que se evitaría la formación del producto de eliminación intramolecular al carecer de la cadena lateral con protones en alfa al carbonilo. Así, el tratamiento de 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo y del alcohol cíclico 1-(2-hidroxiethyl)imidazolidin-2-ona (**Esquema 1.6**) con KHMDS en THF anhidro a temperatura ambiente, condujo al producto de sustitución deseado **1.6** en un 71% de rendimiento, confirmando de esta manera la mayor estabilidad química al medio básico del derivado cíclico de urea.



Esquema 1.6. Reacción de SN_{Ar} en presencia del alcohol cíclico mimético de **Gln** y KHMDS.

1.2.2. Acoplamiento C-N tipo Ullmann

Una vez obtenidos los bromobenzonitrilos sustituidos **1.4** y **1.6**, nos centramos en la correcta funcionalización del anillo de imidazol para introducir la cadena lateral mimética de **Lys**. La síntesis del imidazol **1.7** se llevó a cabo mediante reacción de aminación reductora tal y como se recoge en el **Esquema 1.7**.



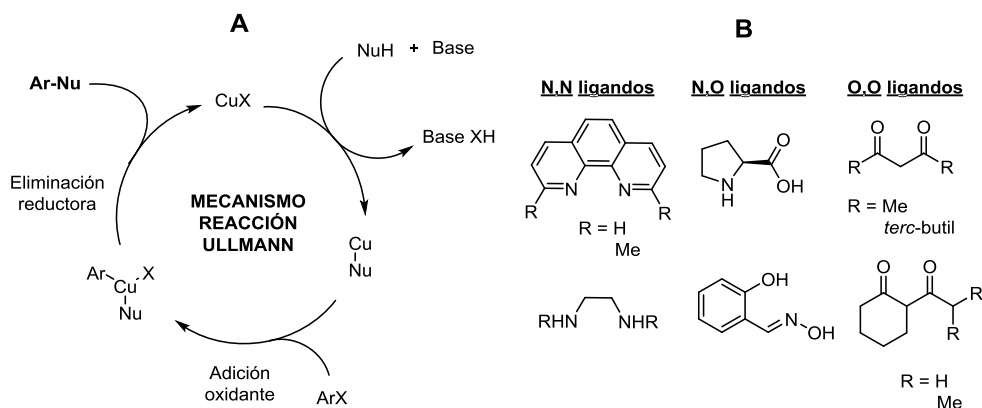
Esquema 1.7. Aminación reductora para la obtener el imidazol sustituido apropiado **1.7**.

Así, el tratamiento de 1H-imidazol-2-carbaldehído y 2-aminoetil carbamato de *terc*-butilo en MeOH, seguido de reducción con NaBH₄ durante 1 hora, condujo al imidazol sustituido **1.7** en un 79% de rendimiento.

A continuación, nos planteamos la reacción de acoplamiento C-N de tipo Ullmann entre dicho imidazol **1.7** y los bromoarenos **1.4** y **1.6** previamente sintetizados.

La reacción “clásica” de Ullmann surgió como una metodología para la síntesis de biarilos mediante la formación de enlaces Csp²-Csp² entre los correspondientes haluros de arilo, en un proceso catalizado por Cu (I).¹⁴ No obstante, esta metodología se extendió posteriormente al empleo de O- y N- nucleófilos¹⁵ para la formación de enlaces O-Csp² y N-Csp², dando lugar a las denominadas reacciones de acoplamiento de tipo Ullmann catalizadas por Cu (I).

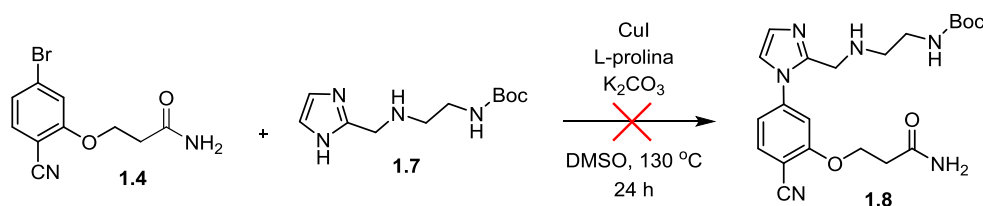
A diferencia de la S_NAr utilizada para la introducción del mimético de **Gln**, donde se requería la presencia de un halógeno pequeño (típicamente F o Cl), en posición *-orto* o *-para* de un grupo fuertemente aceptor como el -CN, la reacción de acoplamiento C-N de tipo Ullmann utiliza preferentemente como sustratos iodo- o bromoarenos que reaccionan con O- y N- nucleófilos en presencia de una base, y requiere de sistemas catalíticos de Cu (I) y ligandos que estabilicen ese estado de oxidación¹⁶ (**Esquema 1.8A**).



Esquema 1.8. A) Mecanismo catalítico en tres etapas por el que transcurre la reacción de Ullmann; B) ejemplos de ligandos bidentados comúnmente utilizados en esta reacción.

Dentro de las reacciones de N-arilación de azoles mediadas por metales de transición como Pd, Ni, o Cu, la ventaja de este último reside principalmente en su mayor estabilidad química y en su bajo coste, lo que convierte a las reacciones catalizadas por cobre, como la reacción de Ullmann, en potentes herramientas para la formación de enlaces Csp²-azol.¹⁷ El estado de oxidación +1 del cobre necesario para el funcionamiento del mecanismo catalítico por el que discurren estas reacciones, requiere el empleo de fuentes como CuI o Cu₂O así como de la presencia adicional de ligandos bidentados que estabilicen dicho estado de oxidación. Por tanto, resulta frecuente en este tipo de acoplamientos el uso de ligandos como β-dicetonas¹⁸, fenantrolina¹⁹, oximas²⁰ o aminoácidos¹⁵, como ejemplos representativos de ligandos O-O, N-N y N-O dadores respectivamente¹⁸ (**Esquema 1.8.B**).

Los intentos iniciales de acoplamiento entre el bromoareno **1.4** y el imidazol **1.7** se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas por Hamilton y col,⁵ en presencia de Cu (I), L-prolina y K₂CO₃ a 130 °C en DMSO durante 24 horas. Sin embargo, en estas condiciones no se detectó la formación del producto deseado **1.8** sino que se obtuvo una mezcla de productos de descomposición que no pudieron ser identificados (**Esquema 1.9**).

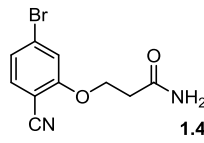
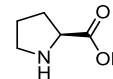
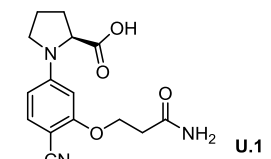
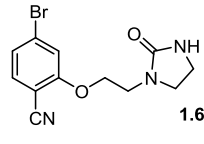
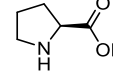
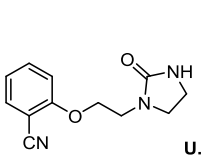
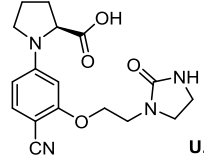
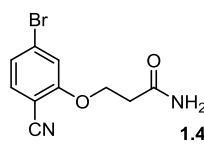
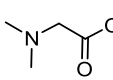
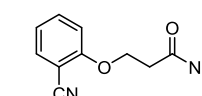
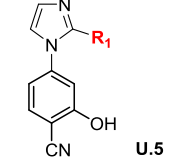
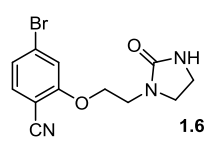
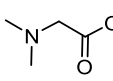
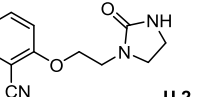
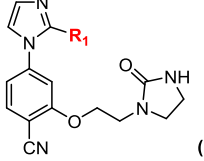
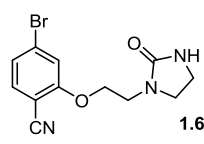
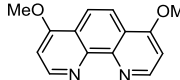
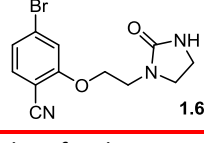
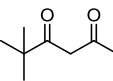


Esquema 1.9. Intento inicial de acoplamiento C-N tipo Ullmann entre **1.4** y el imidazol **1.7**.

A la vista de estos resultados, decidimos llevar a cabo un estudio en profundidad de la reacción explorando diferentes condiciones experimentales descritas en la bibliografía^{21,22}, utilizando distintos tipos de bases, ligandos y condiciones de reacción (**Tabla 1.2**). La evolución de las reacciones se monitorizó por HPLC-MS.

En primer lugar y con el fin de evitar la descomposición observada en las condiciones de reacción anteriores al cabo de 24 horas, se utilizó radiación de microondas para reducir los tiempos de reacción. Así, el empleo de microondas en el acoplamiento de **1.7** en presencia L-prolina como ligando y K₂CO₃ como base a 130 °C durante 1 hora, dio lugar al acoplamiento de la L-prolina con ambos bromoarenos **1.4** y **1.6** (**entradas 1 y 2**). Además, junto con los productos de acoplamiento del ligando **U.1** y **U.3** se detectó también el producto de deshalogenación **U.2** (**entrada 2**).

Tabla 1.2. Resultados obtenidos en el estudio de optimización de la reacción de acoplamiento C-N tipo Ullmann en DMSO.

Entrada	Bromoareno	Base	Fuente de Cu	Ligando	t (h)	Reactor	T (°C)	Productos significativos ^a
1		K ₂ CO ₃	CuI		1	Microondas	130	 U.1
2		K ₂ CO ₃	CuI		1	Microondas	130	 U.2  U.3
3		K ₂ CO ₃	Cu ₂ O		1	Microondas	85	 U.4  U.5
4		CS ₂ CO ₃	Cu ₂ O		1	Microondas	85	 U.2  (1.9)
5		CS ₂ CO ₃	Cu ₂ O		24	Tubo de presión	105	No hay reacción
6		CS ₂ CO ₃	CuI		24	Tubo de presión	105	Descomposición

^a Productos identificados por HPLC-MS

Para intentar solventar estos problemas, se plantearon las siguientes alternativas:

- Emplear N,N-dimetilglicina como ligando bidentado para evitar su acoplamiento con los bromoarenos debido a que posee un nitrógeno terciario menos nucleófilo.
- Disminuir la temperatura de reacción con el fin de obtener una menor proporción de productos de descomposición.

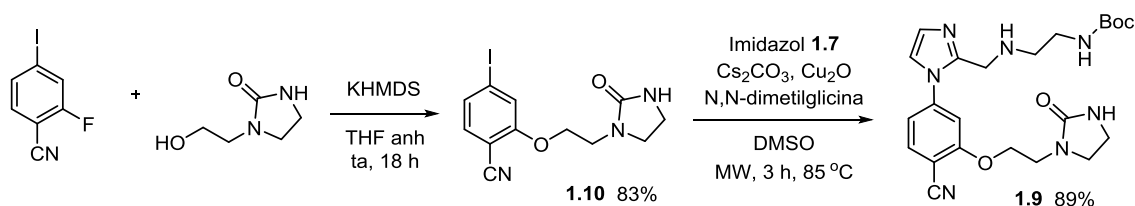
De este modo, la reacción entre el bromoareno **1.4** y el imidazol **1.7** en presencia de N,N-dimetilglicina a 85 °C y microondas (**entrada 3**), dio lugar nuevamente, aunque con bajas conversiones, al producto deshalogenado **U.4** y al producto de eliminación intramolecular **U.5** (confirmando de nuevo la baja estabilidad de la cadena lateral lineal en medio básico). Cabe destacar además que, por primera vez en esta reacción, se pudo detectar mediante HPLC-MS el acoplamiento entre el imidazol y el anillo central.

La baja conversión observada al utilizar K₂CO₃ como base, nos llevó a plantear el empleo de una base más fuerte como Cs₂CO₃, utilizando a partir de ese momento como producto de partida el bromoareno **1.6** para evitar la eliminación intramolecular. La reacción de este bromoareno con el imidazol **1.7** en presencia de Cu₂O, N,N-dimetilglicina, y Cs₂CO₃ como base (**entrada 4**), condujo de nuevo al producto de deshalogenación **U.2**, aunque por primera vez, se identificó en una proporción significativa el producto deseado **1.9** junto con una gran cantidad de producto de partida sin reaccionar.

Finalmente, la utilización de ligandos N-N y O-O dadores como 4,7-dimetoxi-1,10-fenantrolina y dipivaloilmetano respectivamente (**entradas 5 y 6**), no dieron lugar a resultados satisfactorios observándose únicamente producto de partida sin reaccionar en el primer caso y productos de descomposición en el segundo.

La baja reactividad observada en el acoplamiento C-N tipo Ullmann de los bromoarenos **1.4** y **1.6** bajo las distintas condiciones de acoplamiento estudiadas, nos llevó a explorar el empleo de iodoarenos de mayor reactividad¹⁶ en lugar de los bromuros de arilo anteriores (**Esquema 1.10**).

Siguiendo este nuevo planteamiento, el primer paso fue la preparación únicamente del yoduro de arilo **1.10** portador de la urea cíclica, debido a la mayor estabilidad química de esta cadena lateral. Para la síntesis de este compuesto (**Esquema 1.10**) se emplearon nuevamente las mismas condiciones que las utilizadas para la funcionalización de su análogo bromado **1.6**.



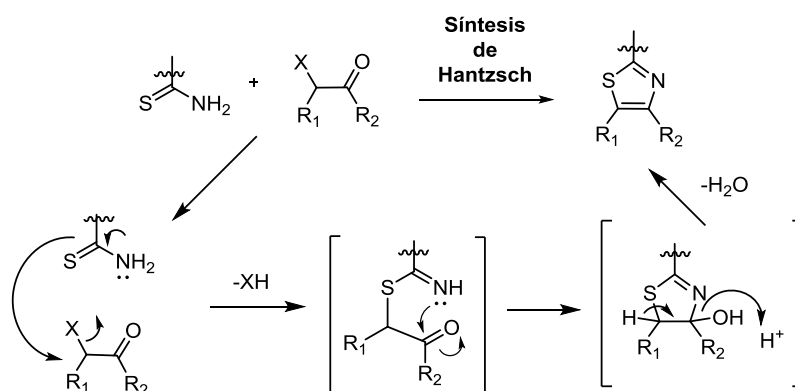
Esquema 1.10. Síntesis del iodoareno **1.10** mediante S_NAr y posterior reacción de acoplamiento de Ullmann con el imidazol **1.7**.

De este modo el tratamiento del 4-iodo-2-fluobenzonitrilo con el alcohol 1-(2-hidroxietil)imidazolidin-2-ona en presencia de KHMDS como base, dio lugar al compuesto **1.10** en un 83% de rendimiento. La posterior reacción de Ullmann entre el imidazol **1.7** y el iodoareno **1.10**, utilizando las condiciones de reacción mencionadas anteriormente en las que se había detectado el producto de acoplamiento C-N deseado (Cs_2CO_3 , Cu_2O , N,N-dimetilglicina y radiación de microondas), permitió obtener finalmente el N-fenilimidazol deseado **1.9** en un 89% de rendimiento (**Esquema 1.10**).

El siguiente paso consistió en la síntesis del anillo de 1,3-tiazol, sustituido con la cadena lateral mimética del residuo de **Ile**.

1.2.3. Síntesis de Hantzsch de tiazoles sustituidos

El anillo de 1,3-tiazol es uno de los heterociclos de 5 miembros más habitual en los fármacos aprobados por la FDA.²³ Su principal ruta de preparación proviene de la ciclación intermolecular entre tioamidas y α -halocarbonilos vía desplazamiento de haluro y posterior condensación, en una reacción comúnmente denominada como síntesis de Hantzsch de tiazoles²⁴ cuyo mecanismo se recoge en el **Esquema 1.11**.

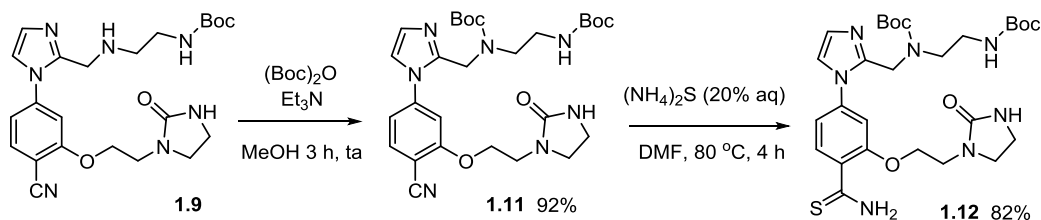


Esquema 1.11. Mecanismo de reacción de la síntesis de Hantzsch de 1,3-tiazoles.

La regioselectividad de la reacción viene determinada por la electronegatividad y tamaño del halógeno (X), junto con la naturaleza del carbonilo.²⁵ Así, el empleo de α -halocetonas o α -haloésteres donde el halógeno es -Cl o -Br, resulta adecuado para la obtención de un único regioisómero como consecuencia del ataque en primera instancia del azufre al Csp^3 .

Teniendo en cuenta estas premisas y volviendo al intermedio **1.9**, con el fin de evitar reacciones secundarias del grupo amino secundario libre en la ciclación de Hantzsch, en primer lugar se llevó a cabo la protección de dicho grupo funcional con un grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc). Así, la reacción de **1.9** con di-carbonato de di-*tert*-butilo y Et_3N ,^{26,27} condujo al compuesto doblemente protegido **1.11** con buenos rendimientos. Posteriormente, el

tratamiento de **1.11** con una disolución acuosa al 20% de sulfuro amónico²⁸, dio lugar a la tioamida **1.12** con un rendimiento del 82% (**Esquema 1.12**).



Esquema 1.12. Protección con Boc del intermedio **1.9** seguido de tionación del grupo nitrilo para dar lugar a la tioamida **1.12**.

El ensachamiento y/o duplicidad de señales observado en el espectro de ^1H -RMN del compuesto **1.12** en DMSO-d_6 a 25 °C, parece indicar un problema dinámico de rotación restringida ocasionada por la introducción del nuevo grupo Boc (**Figura 1.3A**). En dicho espectro se puede observar como las señales de protón que se encuentran dentro del cono de apantallamiento del grupo Boc (señales a-c, e), incluida la señal de este mismo (d), se duplican debido a la presencia de dos rotámeros interconvertibles al aumentar la temperatura de los experimentos a 50 °C y 70 °C, por encima de la temperatura de coalescencia (**Figura 1.3B y C**). Por este, motivo la caracterización estructural de ^1H -RMN de este compuesto se llevó a cabo a 70 °C.

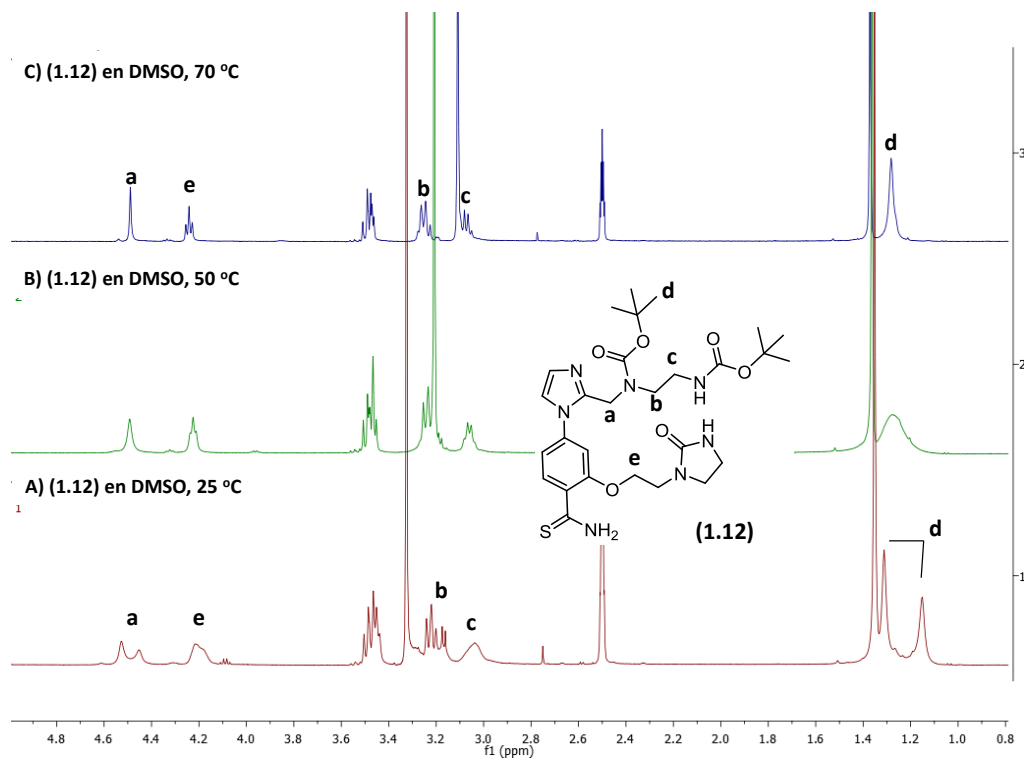
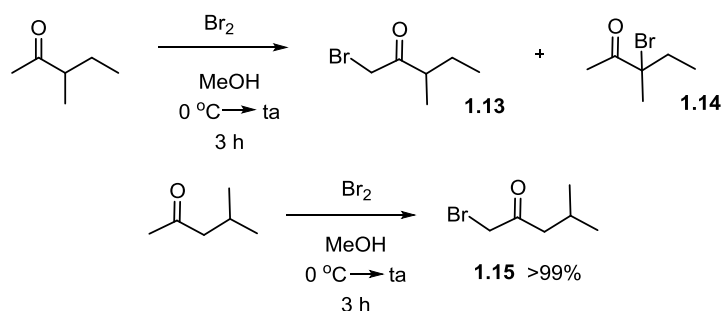


Figura 1.3. Espectro de ^1H RMN de la tioamida **1.12** en DMSO a diferentes temperaturas: **A)** 25 °C; **B)** 50 °C; **C)** 70 °C.

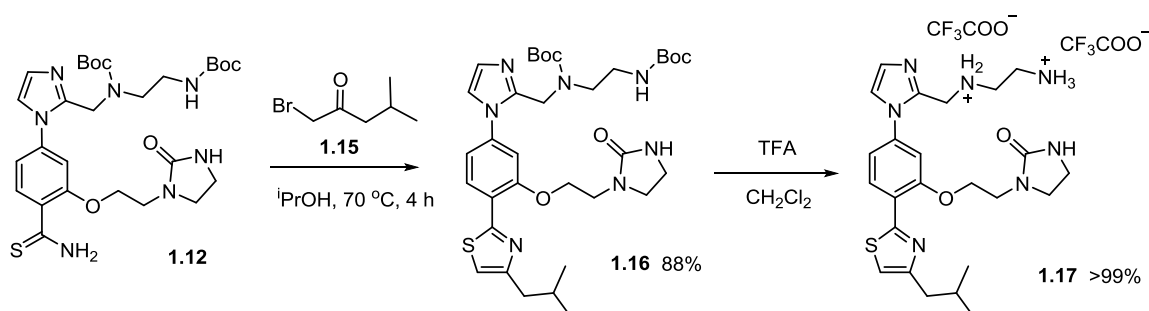
Tras la obtención y caracterización estructural del intermedio de tioamida **1.12**, fue necesaria la preparación de la α -bromocetona no comercial portadora de la cadena lateral que mimetiza el residuo de **IIe**. Para ello, el tratamiento de 3-metilpentan-2-ona con 1 equivalente de Br_2 en MeOH a 0 °C, dejando alcanzar la temperatura ambiente tras la adición, dio lugar a una mezcla irresoluble de regioisómeros **1.13** y **1.14** en proporciones equimoleculares (estimadas por ^1H -RMN) debido a la bromación de las posiciones 1- y 3- (**Esquema 1.13**).



Esquema 1.13. Bromación de 3-metilpentan-2-ona y 4-metilpentan-2-ona.

Con el objetivo de lograr una bromación selectiva de la posición 1-, decimos utilizar como producto de partida la 4-metilpentan-2-ona, estéricamente más impedida en la posición 3. Así, el tratamiento de dicha cetona comercial con 1 equivalente de Br_2 en MeOH en condiciones idénticas a las anteriores, permitió bromar selectivamente la posición terminal²⁹ obteniéndose la bromocetona **1.15** con rendimiento cuantitativo (**Esquema 1.13**).

A continuación, se llevó a cabo la síntesis de Hantzsch por reacción de la tioamida **1.12** con la bromocetona **1.15** calentando a 70 °C en $i\text{PrOH}$ durante 4 horas, obteniéndose el derivado protegido **1.16** en un 88% de rendimiento. Finalmente, la desprotección³⁰ de **1.16** con ácido trifluoroacético (TFA) en CH_2Cl_2 condujo al proteomimético final desprotegido **1.17** con rendimiento cuantitativo (**Esquema 1.14**).



Esquema 1.14. Ciclación de Hantzsch para obtener el 1,3-tiazol **1.16**, y desprotección cuantitativa con TFA para obtener el proteomimético final **1.17**.

1.3. Modificaciones estructurales en la posición R_3

Una vez puesto a punto el procedimiento sintético para la obtención del primer proteomimético basado en el esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol, decidimos llevar a cabo modificaciones estructurales en el sustituyente hidrófobo R_3 (Figura 1.4).

La elección de esta posición, se basó en el análisis previo de la interfaz de dimerización de *Li-TryR*² realizado con el programa cGRILL³, que reveló la importancia de la región hidrófoba constituida por los residuos Val441', Phe454' y Leu468' para la interacción del péptido prototipo **P1**. Estudios previos a esta tesis doctoral² empleando el servidor DoGSiteScorer^{31,32} y el programa de identificación de regiones de unión fpocket^{33,34}, para el análisis de la superficie y el volumen del dominio de dimerización, apoyaron la gran importancia que tiene esta zona hidrófoba en las interacciones de la interfaz. Finalmente, los estudios de *docking* del péptido **P1** sobre el monómero de *Li-TryR* (PDB: 2JK6) (Figura 1.4A), mostraron la posibilidad de que la región próxima al residuo Ile9 pudiera albergar sustituyentes alifáticos de mayor tamaño, o incluso aromáticos que podrían dar lugar a interacciones de tipo π -stacking con la Phe454'.

Además de los trabajos computacionales, la convergencia que presenta la ruta sintética para la introducción de sustituyentes en posición R_3 mediante síntesis de Hantzsch, facilita la funcionalización del *scaffold* en dicha posición, permitiendo ampliar la librería de compuestos con un menor coste sintético.

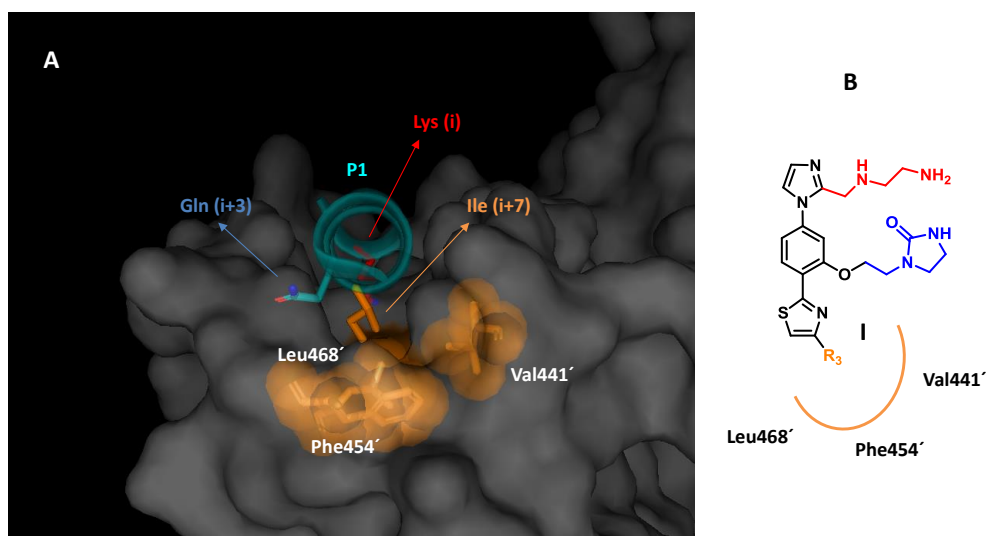
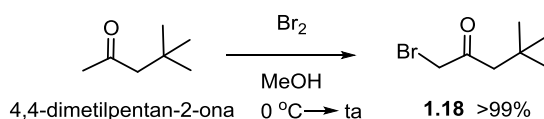


Figura 1.4. A) Modelo de interacción del péptido prototipo **P1** con el monómero de *Li-TryR* y región hidrófoba que aloja el residuo de **Ile**; B) Estructura general de los nuevos compuestos de fórmula I.

En base a este diseño, nos planteamos la síntesis de una pequeña librería de compuestos de fórmula general **I** (Figura 1.4B), portadores de grupos hidrófobos de distinta naturaleza tanto alifáticos (*terc*-butilo) como aromáticos (fenilo, naftilo o bifenilo), unidos a la posición 4-del tiazol a través de un espaciador de 1 o 2 metilenos. No obstante, cabe mencionar que la

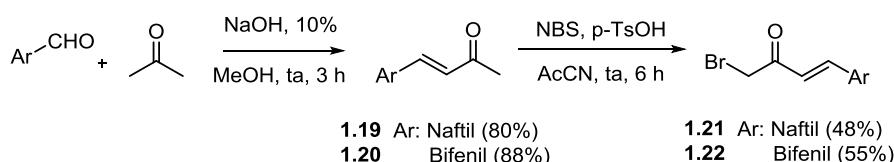
elección de los sustituyentes R_3 viene limitada fundamentalmente por la accesibilidad comercial o sintética de las α -halocetonas necesarias para la síntesis de Hantzsch.

Con el objetivo por tanto de introducir variedad estructural en R_3 , se llevó a cabo en primer lugar la síntesis de las α -bromocetonas no comerciales. De este modo, la bromación de la 4,4-dimetilpentan-2-ona con Br_2 en MeOH siguiendo las condiciones anteriormente mencionadas²⁹, nos permitió obtener regioselectivamente la α -bromocetona de *tert*-butilo **1.18** con rendimientos cuantitativos (**Esquema 1.15**).



Esquema 1.15. Bromación selectiva de la posición terminal de la 4,4-dimetilpentan-2-ona.

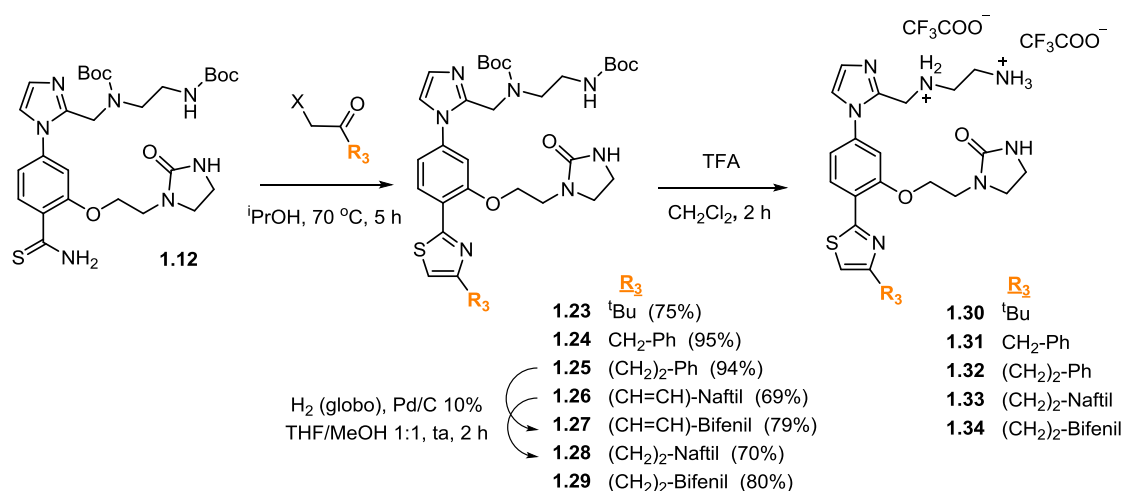
A diferencia de las halocetonas aromáticas de bencilo y fenetilo comercialmente disponibles, la obtención de bromocetonas con residuos de naftilo y bifenilo en posición β del carbonilo, supuso un reto sintético debido a la dificultad nuevamente de bromar selectivamente la posición 1- de la cetona de partida. Con el fin de dirigir la bromación a la posición terminal, nos planteamos la preparación de los precursores α,β -insaturados **1.19** y **1.20**, donde las posiciones alfa 1- y 3- de la cetona se encuentran claramente diferenciadas (**Esquema 1.16**).



Esquema 1.16. Síntesis de las cetonas α,β -insaturadas **1.21** y **1.22** mediante condensación aldólica y posterior bromación selectiva de la posición terminal con NBS.

Así, llevamos a cabo en primer lugar la condensación aldólica entre los aldehídos aromáticos correspondientes y acetona, empleando una disolución acuosa de NaOH al 10% a temperatura ambiente durante 3 horas, lo que condujo a los derivados α,β -insaturados **1.19** y **1.20** en un 80 y 88% de rendimiento, respectivamente. En segundo lugar, la bromación selectiva de estos compuestos con N-bromosuccinimida (NBS) y ácido *p*-toluensulfónico (*p*-TsOH) siguiendo procedimientos descritos en la bibliografía^{35,36}, nos permitió obtener las bromocetonas **1.21** y **1.22** en un 48 y 55% de rendimiento respectivamente.

A continuación, llevamos a cabo la síntesis de Hantzsch³⁷ a partir de la tioamida **1.12**, previamente sintetizada, y las correspondientes α -halocetonas en i PrOH a 70 °C, obteniéndose los derivados **1.23** - **1.27** con buenos rendimientos (69 - 95%) (**Esquema 1.17**).



Esquema 1.17. Síntesis de los proteomiméticos finales **1.30 - 1.34**.

La hidrogenación de los derivados insaturados **1.26** y **1.27** con hidrógeno, usando Pd/C al 10% como catalizador,³⁸ condujo a los derivados saturados **1.28** y **1.29** en un 79 y 80% de rendimiento. Finalmente, el tratamiento de los derivados Boc-protegidos con TFA en CH_2Cl_2 ,³⁰ dio lugar a los proteomiméticos finales desprotegidos **1.30 - 1.34** en forma de sales de trifluoroacetato con rendimientos cuantitativos (**Esquema 1.17**).

1.4. Evaluación biológica

Todos los compuestos de esta Tesis Doctoral han sido evaluados en ensayos enzimáticos de inhibición de la actividad oxidorreductasa y de la dimerización de la TryR de *L. infantum* por el grupo del Prof. Antonio Jiménez (UAH). Además, los compuestos más representativos se han ensayado también en cultivo celular de parásitos extra- e intracelulares.

1.4.1. Ensayos enzimáticos

• Ensayo de inhibición de la actividad de la Li-TryR

El equipo del Prof. Jiménez ha puesto a punto un ensayo colorimétrico (similar al ensayo descrito por Hamilton y col³⁹), que permite medir la actividad de TryR mediante la cuantificación de la aparición de ácido tionitrobenzoico (TNB) (**Figura 1.5**).⁴

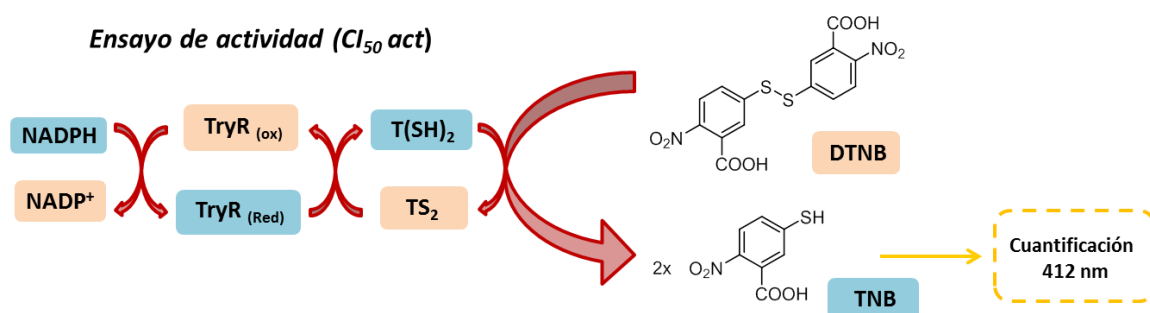


Figura 1.5. Ensayo de actividad de la TryR acoplado a DTNB.

En este ensayo, el poder reductor del NADPH se transmite secuencialmente a través de la TryR y de la molécula de tripanotión oxidado (TS₂), hasta el aceptor final de electrones que es el ácido ditionitrobenzoico (DTNB). Este último, se reduce a la especie detectable TNB regenerándose así el tripanotión oxidado previamente reducido por la acción de la enzima. El progreso de la reacción se sigue por colorimetría analizando la absorción del TNB a 412 nm. La medida de la inhibición de la actividad se realiza incubando la enzima en presencia de distintas concentraciones de compuesto disuelto en DMSO, siguiéndose el transcurso de la reacción catalítica durante 60 minutos.

- **Ensayo de inhibición de la dimerización de Li-TryR**

Para los ensayos de inhibición de la dimerización, el grupo del Prof. Antonio Jiménez ha diseñado un novedoso ensayo basado en el método descrito por Sluis-Cremer y col⁴⁰ para medir la inhibición de la dimerización de la transcriptasa inversa (TI) del VIH. Este procedimiento consiste en el marcaje de una TryR silvestre con un FLAG-tag, y ponerla en contacto con otra TryR silvestre marcada con His-tag.⁴

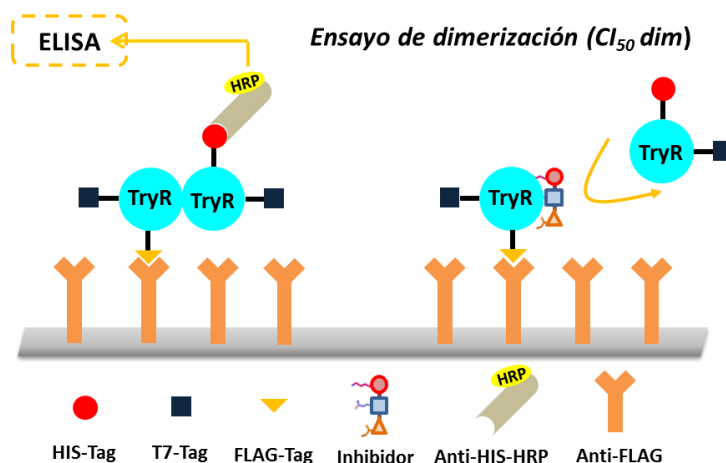


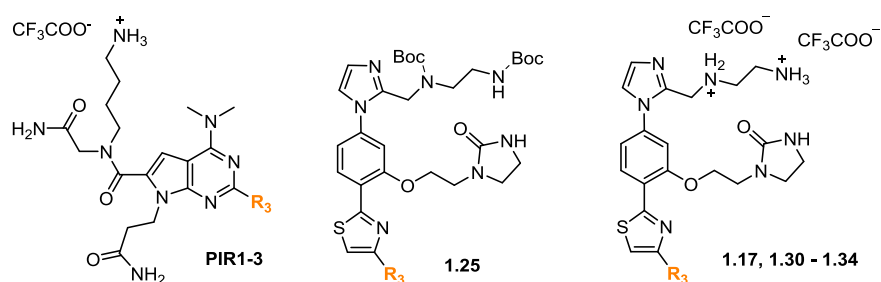
Figura 1.6. Ensayo ELISA para la cuantificación de la inhibición de la dimerización de TryR.

Dado que el proceso de dimerización es un equilibrio entre los dímeros y sus respectivos monómeros, transcurrido un tiempo suficiente y bajo las condiciones adecuadas, se forman un determinado porcentaje de heterodímeros His-tag/FLAG-tag junto con los homodímeros correspondientes. Posteriormente, en una placa tapizada con el anticuerpo anti-FLAG se retienen selectivamente los dímeros FLAG-tag/FLAG-tag y His-tag/FLAG-tag, eliminándose por lavado el homodímero His-tag/His-tag. Finalmente se realiza un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) empleando un anticuerpo anti-His, de manera que se detecta selectivamente el heterodímero en presencia y ausencia de distintas concentraciones de compuesto (Figura 1.6).⁴

Resultados biológicos de inhibición enzimática

Siguiendo los procedimientos descritos en los dos apartados anteriores, se evaluó tanto la inhibición de la actividad oxidorreductasa como del proceso de dimerización de la *Li*-TryR de los compuestos finales **1.17** y **1.30** - **1.34**. En la **Tabla 1.3** se recogen los valores de Cl_{50} en el ensayo de actividad (Cl_{50} act), así como los porcentajes de desdimerización observados a una concentración de 20 μ M de compuesto. Junto con los proteomiméticos finales se evaluó también el intermedio Boc protegido **1.25**. Como referencia se evaluaron el prototipo peptídico **P1** y la mepacrina, un inhibidor conocido de TryR.⁴¹ Además se incluyeron, con fines comparativos, las pirrolopirimidinas más representativas **PIR1**, **PIR2** y **PIR3**, sintetizadas en nuestro grupo de investigación⁴² en un proyecto paralelo de búsqueda de proteomiméticos con estructura rígida y preorganizada basada en el esqueleto de pirrolopirimidina.⁴³

Tabla 1.3. Datos de evaluación biológica de los proteomiméticos **1.17**, **1.25**, **1.30** - **1.34**, de las pirrolopirimidinas **PIR1-3**, del péptido prototipo **P1** y de la mepacrina como compuestos de referencia.



Compuesto	R_3	Cl_{50} act (μ M) ^a	Desdimerización (%) ^b
P1	/	1.5 \pm 0.2	95
Mepacrina	/	12.9 \pm 0.5	/
PIR1	-NH- ⁱ butil	>200	0
PIR2	-NH-(CH ₂) ₂ -Naftil	52.2 \pm 1.8	0
PIR3	-NH-(CH ₂) ₂ -Bifenil	51.7 \pm 5.7	0
1.25	-(CH ₂) ₂ -Ph	>200	0
1.17	- ⁱ propil	51.2 \pm 4.6	0
1.30	- ^t butil	51.3 \pm 6.1	0
1.31	-CH ₂ -Ph	32.8 \pm 2.3	0
1.32	-(CH ₂) ₂ -Ph	22.4 \pm 2.2	0
1.33	-(CH ₂) ₂ -Naftil	5.1 \pm 0.4	26
1.34	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	8.6 \pm 1.4	32

^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la actividad de la enzima o la formación del dímero. Los experimentos se realizan por triplicado.

Cabe destacar en primer lugar que el intermedio sintético protegido **1.25** resultó inactivo en ambos ensayos, lo que indica la importancia de los grupos amino libres para la actividad de los compuestos. Los derivados con sustituyentes alifáticos **1.17** y **1.30** presentaron unos valores moderados de inhibición de la actividad oxidorreductasa, mientras que los compuestos portadores de grupos bencilo y fenetilo (**1.31** y **1.32**) mejoraron ligeramente la capacidad inhibitoria respecto a los derivados alifáticos anteriores. Sin embargo, la introducción de grupos poliaromáticos como naftilo o bifenilo de mayor volumen (**1.33** y **1.34**), unidos a través de un espaciador etilénico al tiazol, sí dio lugar a una mejora muy significativa de la CI_{50} act, situándolos en niveles iguales o incluso superiores a la mepacrina y sólo de 3 a 5 veces menos activos que el péptido de referencia. En cuanto al ensayo de dimerización, cabe resaltar que por lo general, los compuestos no fueron capaces de alterar el estado dimérico de la *Li*-TryR. Tan sólo los compuestos más activos **1.33** y **1.34** mostraron un ligero efecto desdimerizador ($\approx 30\%$) a una concentración de 20 μM de compuesto (**Figura 1.7**). Sin embargo, el aumento de la concentración de ambos compuestos por encima de 20 μM no generó una disminución del porcentaje de homodímero, lo que imposibilitó el cálculo de una CI_{50} fiable.

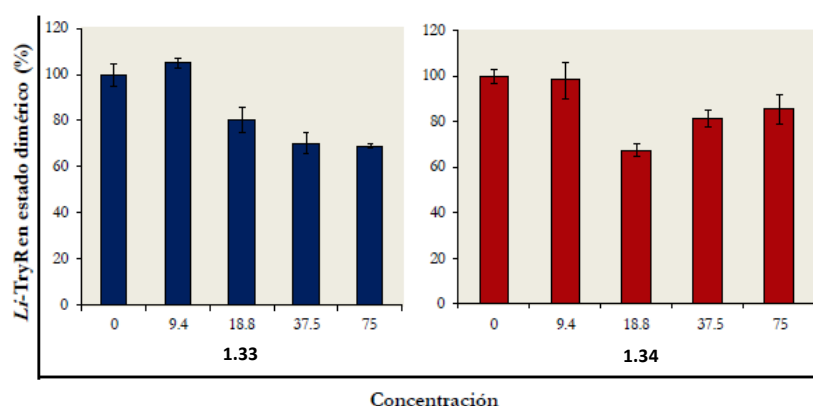


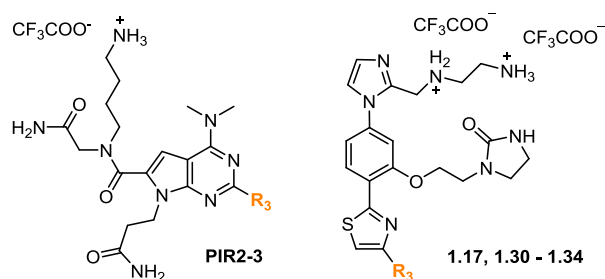
Figura 1.7. Ensayo de cuantificación de *Li*-TryR dimérica tras incubación con diferentes concentraciones de los proteomiméticos **1.33** y **1.34**.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la importancia de la naturaleza del sustituyente hidrófobo en **R₃** para la inhibición de la actividad/dimerización de la enzima. Finalmente, la comparación de los resultados obtenidos con el esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol con respecto al de pirrolopirimidina, permitió observar que, si bien dentro de la misma serie los mejores resultados se obtienen para los mismos sustituyentes poliaromáticos de naftaleno (**PIR2** y **1.33**) y bifenilo (**PIR3** y **1.34**), la capacidad inhibitoria de los derivados de imidazol resultó en torno a un orden de magnitud superior a la de los análogos de pirrolopirimidina, para los que además no se observó capacidad desdimerizadora. Estos últimos resultados resaltaron por tanto la importancia del esqueleto del proteomimético para la actividad inhibitoria, siendo el de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol mucho más efectivo que el de pirrolopirimidina en nuestras IPPs.⁴²

1.4.2. Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad

La actividad leishmanicida de los compuestos se evaluó en cultivo celular frente a parásitos promastigotes (morfología presente en el vector invertebrado), y frente a amastigotes axénicos (morfología presente en el huésped mamífero). La citotoxicidad se evaluó en la línea hepática humana HepG2. Los resultados obtenidos se reflejan en la **Tabla 1.4** como valores de concentración efectiva CE_{50} . Como controles se utilizaron miltefosina, un fármaco aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis, y el conjugado peptídico **R₉-P1**. Recordar que este último es el polipéptido Ac-**RRRRRRRRPKIIQSVGISNleKNle**-NH₂ resultado de unir al péptido de referencia **P1** un péptido de penetración celular (CPPs) basado en poliargininas, para facilitar la entrada del compuesto al interior del parásito.⁴⁵

Tabla 1.4. Valores de $CE_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM) de los proteomiméticos **1.17**, **1.30** - **1.34**, del péptido prototipo conjugado **R₉-P1**, del fármaco antileishmania miltefosina y de **PIR2** - **3**, frente a promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y frente a hepatocitos HepG2 al cabo de 24 h.



Compuesto	R ₃	CE ₅₀ promastigotes (μM) ^a	CE ₅₀ amastigotes (μM) ^a	CE ₅₀ HepG2 (μM) ^a	IS ^b
R₉-P1	/	4.6 \pm 0.2	3.5 \pm 0.9	12.6 \pm 3.5 ^c	2.7/3.6
Miltefosina	/	47.6 \pm 0.6	2.0 \pm 0.1	≥ 75	$\geq 1.6/27$
PIR2	-NH-(CH ₂) ₂ -Naftil	≥ 25	≥ 25	≥ 25	/
PIR3	-NH-(CH ₂) ₂ -Bifenil	≥ 25	≥ 25	≥ 25	/
1.17	- ⁱ propil	≥ 25	≥ 25	≥ 25	/
1.30	- ^t butil	≥ 25	≥ 25	≥ 25	/
1.31	-CH ₂ -Ph	≥ 25	≥ 25	≥ 25	/
1.32	-(CH ₂) ₂ -Ph	≥ 25	≥ 25	≥ 25	/
1.33	-(CH ₂) ₂ -Naftil	12.8 \pm 0.8	12.8 \pm 1.4	27.1 \pm 2.4	2.1/2.1
1.34	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	5.3 \pm 0.3	5.3 \pm 0.2	14.2 \pm 0.9	2.7/2.7

^a Concentración de compuesto necesaria para causar una disminución del 50% de la concentración de parásitos o de las células humanas. ^b Índice de selectividad frente a promastigote/amastigote. ^c La citotoxicidad está medida en líneas celulares THP-1.⁴²

Como resultados más relevantes cabe destacar que los inhibidores **1.17** y **1.30 - 1.32** no mostraron actividad leishmanicida a la concentración más alta utilizada (25 μ M). Los derivados de imidazol sustituidos con grupos naftilo y bifenilo **1.33** y **1.34** en cambio, sí mostraron actividad frente a promastigotes y amastigotes con valores de CE_{50} a nivel micromolar. Resultó especialmente destacable el derivado de bifenilo **1.34** que mostró una actividad leishmanicida similar a la del conjugado peptídico **R₉-P1** y a la miltefosina, lo que demuestra en primer lugar que estamos ante moléculas pequeñas con una buena permeabilidad celular. En cuanto a los valores de citotoxicidad de los compuestos activos **1.33** y **1.34** en líneas celulares humanas, se observó una ligera selectividad hacia los parásitos con índices de selectividad (IS) moderados frente a ambas morfologías similares al péptido de referencia.

Cabe resaltar la correlación entre la inhibición enzimática y la actividad leishmanicida en cultivo celular exhibida por todos los compuestos, siendo los inhibidores más potentes **1.33** y **1.34** los únicos que presentaron propiedades leishmanicidas, lo que parece apoyar la idea de que la TryR podría ser una de las dianas intracelulares responsable de la muerte del parásito. Por último, ninguna de las pirrolopirimidinas evaluadas mostró actividad leishmanicida en estos ensayos, poniendo en valor el mejor comportamiento de los compuestos derivados del *scaffold* de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol respecto a la pirrolopirimidina en ensayos en cultivo celular.⁴² Destacar también en este punto que la fluorescencia intrínseca de los derivados de imidazol, la cual se estudiará con más detalle junto con los derivados del **Capítulo 2**, ha permitido su visualización directa en el interior del parásito.

1.4.3. Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares

Una vez evaluada la actividad leishmanicida frente a parásitos extracelulares, así como la citotoxicidad de estos proteomiméticos, decidimos analizar su efecto en amastigotes intracelulares. Para ello se utilizaron líneas de monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos, e infectados con amastigotes axénicos que expresan la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP). Este modelo *in vitro* representa una aproximación más cercana a la realidad y por tanto más interesante desde el punto de vista clínico puesto que, aunque ambas morfologías del parásito pueden infectar células fagocíticas (macrófagos y otras células dentríticas) del mamífero hospedador, sólo los amastigotes tienen la capacidad de persistir.⁴⁶

Los resultados obtenidos de la evaluación biológica de los compuestos **1.33** y **1.34** frente a macrófagos infectados se muestran en la **Tabla 1.5**.

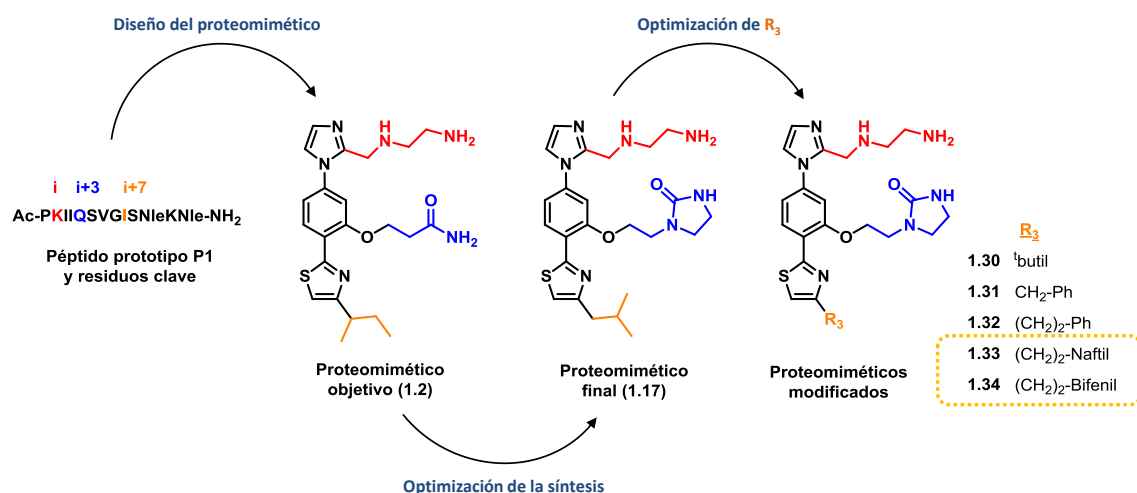


Figura 1.8. Resumen de la evolución en el diseño llevada cabo desde el péptido **P1** antecesor, hasta los proteomiméticos finales **1.17**, **1.30 - 1.34**.

Los resultados más relevantes de este capítulo son:

- A pesar de haberse optimizado la reacción del $\text{S}_{\text{N}}_{\text{Ar}}$ entre el 4-bromo-fluorobenzonitrilo y el alcohol lineal 3-hidroxiopropanamida empleando bases adecuadas como K_2CO_3 o Cs_2CO_3 , la baja estabilidad química al medio básico del producto resultante **1.4**, ha hecho necesario el uso de ureas cíclicas como miméticos del residuo de **Gln**.
- Se ha realizado un estudio de optimización del acoplamiento C-N tipo Ullmann entre diferentes haloarenos y el imidazol **1.7**, en el que el uso de iodoarenos de mayor reactividad que sus bromuros análogos, en presencia de Cu_2O , *N,N*-dimetilglicina como ligando y Cs_2CO_3 como base ha permitido obtener el producto de acoplamiento deseado **1.9** en muy buenos rendimientos del 89 %.
- El uso de metilcetonas alifáticas con mayor impedimento estérico, y de metilcetonas α,β -insaturadas, nos ha permitido la bromación regioselectiva de la posición terminal de las mismas obteniéndose las α -bromocetonas necesarias para la posterior síntesis de Hantzsch de tiazoles.
- En cuanto a los resultados biológicos obtenidos podemos concluir que los proteomiméticos **1.33** y **1.34** (Figura 1.8) representan el primer ejemplo de inhibidor moderado de la dimerización de *Li*-TryR basado en molécula pequeña, con actividad leishmanicida potente frente a parásito extra- e intracelular lo que demuestra una buena permeabilidad celular, aunque los compuestos han mostrado una baja selectividad respecto a líneas celulares humanas, similar al péptido de referencia.

1.6. Bibliografía

- (1) Yin, H.; Lee, G. I.; Sedey, K. A.; Kutzki, O.; Park, H. S.; Orner, B. P.; Ernst, J. T.; Wang, H. G.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Terphenyl-based Bak BH3 α -helical proteomimetics as low-molecular-weight antagonists of Bcl-XL. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (29), 10191–10196. <https://doi.org/10.1021/ja050122x>.
- (2) Ruiz-Santaquiteria, M. De Péptidos a peptidomiméticos en la búsqueda de inhibidores novedosos de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* (Li-TryR), **2017**, Universidad Complutense de Madrid.
- (3) cGRILL <http://farmamol.uah.es/index.php/en/>.
- (4) Toro, M. A.; Sánchez-Murcia, P. A.; Moreno, D.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Alzate, J. F.; Negri, A.; Camarasa, M. J.; Gago, F.; Velázquez, S.; Jiménez-Ruiz, A. Probing the dimerization interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with site-directed mutagenesis and short peptides. *ChemBioChem.* **2013**, *14* (10), 1212–1217. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200744>.
- (5) Cummings, C. G.; Ross, N. T.; Katt, W. P.; Hamilton, A. D. Synthesis and biological evaluation of a 5-6-5 imidazole-phenyl-thiazole based α -helix mimetic. *Org. Lett.* **2009**, *11* (1), 25–28. <https://doi.org/10.1021/ol8022962>.
- (6) Kutzki, O.; Park, H. S.; Ernst, J. T.; Orner, B. P.; Yin, H.; Hamilton, A. D. Development of a potent Bcl-XL antagonist based on α -helix mimicry. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (40), 11838–11839. <https://doi.org/10.1021/ja026861k>.
- (7) Daniel. B.; Olivier. C.; Sylvaine. C.; Corinna. G.; Xavier. L.; Davide. P.; Richard-Bildstein, S. PCT Int. Appl. WO 2011-IB55125, **2011**.
- (8) Rogers, J. F.; Green, D. M. Mild Conversion of electron deficient aryl fluorides to phenols using 2-(methylsulfonyl)ethanol. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (19), 3585–3587. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)00561-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)00561-0).
- (9) Liu, Y.; Park, S. K.; Xiao, Y.; Chae, J. Copper(I)-catalyzed C-O coupling of aryl bromides with aliphatic diols: Synthesis of ethers, phenols, and benzo-fused cyclic ethers. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (26), 4747–4753. <https://doi.org/10.1039/c4ob00649f>.
- (10) Lipshutz, B. H.; Ghorai, S.; January, R. V. Deprotection of homoallyl ((h) Allyl) derivatives of phenols, alcohols, acids, and amines. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (7), 2854–2857. <https://doi.org/10.1021/jo900012z>.
- (11) Ehara, T.; Grosche, P.; Irie, O.; Iwaki, Y.; Kanazawa, T.; Kawakami, S.; Konishi, K.; Mogi, M.; Suzuki, M.; Yokokawa, F. 3, 5-substituted piperidine compounds as renin inhibitors. EP2420491A1**2006**.
- (12) Meanwell, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591. <https://doi.org/10.1021/jm1013693>.
- (13) Sun, S.; Zhang, Z.; Kodumuru, V.; Pokrovskaya, N.; Fonarev, J.; Jia, Q.; Leung, P. Y.; Tran, J.; Ratkay, L. G.; McLaren, D. G.; et al. Systematic evaluation of amide bioisosteres leading to the discovery of novel and potent thiazolylimidazolidinone inhibitors of SCD1 for the treatment of metabolic diseases. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (2), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.12.036>.
- (14) Fanta, P. E. The Ullmann synthesis of biaryls. *Synthesis (Stuttg).* **1974**, *1974* (01), 9–21. <https://doi.org/10.1055/s-1974-23219>.

- (15) Shafir, A.; A. S.; Buchwald, S. L. Highly selective room-temperature copper-catalyzed C–N coupling reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8742–8743. <https://doi.org/10.1021/JA063063B>.
- (16) Drapeau, M. P.; Ollevier, T.; Taillefer, M. On the frontier between nucleophilic aromatic substitution and catalysis. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (18), 5231–5236. <https://doi.org/10.1002/chem.201304164>.
- (17) Zhang, H.; Cai, Q.; Ma, D. Amino acid promoted CuI-catalyzed C–N bond formation between aryl halides and amines or N-containing heterocycles. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (13), 5164–5173. <https://doi.org/10.1021/jo0504464>.
- (18) Kotovshchikov, Y. N.; Latyshev, G. V.; Lukashev, N. V.; Beletskaya, I. P. An Efficient approach to azolyl-substituted steroids through copper-catalyzed Ullmann C–N coupling. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 34, 7823–7832. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300719>.
- (19) Altman, R. A.; Buchwald, S. L. 4,7-Dimethoxy-1,10-phenanthroline: An excellent ligand for the Cu-catalyzed N-arylation of imidazoles. *Org. Lett.* **2006**, *8* (13), 2779–2782. <https://doi.org/10.1021/ol0608505>.
- (20) Cristau, H. J.; Cellier, P. P.; Spindler, J. F.; Taillefer, M. Highly efficient and mild copper-catalyzed N- and C-arylations with aryl bromides and iodides. *Chem. - A Eur. J.* **2004**, *10* (22), 5607–5622. <https://doi.org/10.1002/chem.200400582>.
- (21) Mečiarová, M.; Podlesná, J.; Toma, Š. Study of S_NAr reactions of halobenzenes with imidazole under ultrasonic and microwave irradiation. *Monatshefte für Chemie.* **2004**, *135* (4), 419–423. <https://doi.org/10.1007/s00706-003-0141-y>.
- (22) Sun, X.; Qiu, J.; Strong, S. A.; Green, L. S.; Wasley, J. W. F.; Blonder, J. P.; Colagiovanni, D. B.; Mutka, S. C.; Stout, A. M.; Richards, J. P. Discovery of potent and novel S-nitrosoglutathione reductase inhibitors devoid of cytochrome P450 activities. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (19), 5849–5853. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.103>.
- (23) Mak, J. Y. W.; Xu, W.; Fairlie, D. P. Thiazoles in peptides and peptidomimetics. *Top. Heterocycl. Chem.* **2015**, 235–266. https://doi.org/10.1007/7081_2015_176.
- (24) Hantzsch, A.; Weber, J. H. Ueber Verbindungen Des Thiazols (Pyridins Der Thiophenreihe). *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft.* **1887**, *20* (2), 3118–3132. <https://doi.org/10.1002/cber.188702002200>.
- (25) Yet, L. Five-membered ring systems. *Progress in heterocycle chemistry.* **2016**, *28*, Chapter 5.4, 275–315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100755-6.00008-9>.
- (26) Cai, J.; Wei, H.; Hong, K. H.; Wu, X.; Cao, M.; Zong, X.; Li, L.; Sun, C.; Chen, J.; Ji, M. Discovery and preliminary evaluation of 2-aminobenzamide and hydroxamate derivatives containing 1,2,4-oxadiazole moiety as potent histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.002>.
- (27) Holden, J. K.; Dejam, D.; Lewis, M. C.; Huang, H.; Kang, S.; Jing, Q.; Xue, F.; Silverman, R. B.; Poulos, T. L. Inhibitor bound crystal structures of bacterial nitric oxide synthase. *Biochemistry.* **2015**, *54* (26), 4075–4082. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00431>.

- (28) Charette, A. B.; Grenon, M. Mild method for the conversion of amides to thioamides. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (14), 5792–5794. <https://doi.org/10.1021/jo0344485>.
- (29) Nair, R. N.; Bannister, T. D. Grubbs cross-metathesis pathway for a scalable synthesis of γ -keto- α,β -unsaturated Esters. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (3), 1467–1472. <https://doi.org/10.1021/jo4023606>.
- (30) Ninkovic, S.; Braganza, J. F.; Collins, M. R.; Kath, J. C.; Li, H.; Richter, D. T. 6-substituted 2-heterocyclamino pyrazine compounds as CHK-1 inhibitors. US8518952B2. **2010**.
- (31) Volkamer, A.; Kuhn, D.; Rippmann, F.; Rarey, M. Dogsitescorer: A web server for automatic binding site prediction, analysis and druggability assessment. *Bioinformatics.* **2012**, *28* (15), 2074–2075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts310>.
- (32) DoGSiteScorer <http://dogsite.zbh.uni-hamburg.de>.
- (33) Le Guilloux, V.; Schmidtke, P.; Tuffery, P. Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection. *BMC Bioinformatics.* **2009**, *10* (1), 168–179. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-168>.
- (34) fpocket <https://github.com/Discngine/fpocket>.
- (35) Ngo, Q. A.; Nguyen, L. A.; Vo, N. B.; Nguyen, T. H.; Roussi, F.; Nguyen, T. H.; Nguyen, V. T. Synthesis and antiproliferative activity of new vinca alkaloids containing an α,β -unsaturated aromatic side chain. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (23), 5597–5600. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.040>.
- (36) Jong, C. L.; Yong, H. B.; Chang, S. K. *Korean Chem. Soc.* **2003**, *24* (4), 407–408. <https://doi.org/10.1039/c2jm31531a>.
- (37) Fitton, A. O.; Smalley, R. K. *Practical Heterocyclic Chemistry*. Elsevier, Ed. **1968**.
- (38) Wei, Z.; Gong, Y.; Xiong, T.; Zhang, P.; Li, H.; Wang, Y. Highly efficient and chemoselective hydrogenation of α,β -unsaturated carbonyls over Pd/N-doped hierarchically porous carbon. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5* (1), 397–404. <https://doi.org/10.1039/c4cy00946k>.
- (39) Hamilton, C. J.; Saravanamuthu, A.; Eggleston, I. M.; Fairlamb, A. H. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione *in situ*: Substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.* **2003**, *369* (3), 529–537. <https://doi.org/10.1042/bj20021298>.
- (40) Sluis-Cremer, N.; Hamamouch, N.; Fe, A. S. Structure - activity relationships of [2',5'-bis-O-(*Tert* -butyldimethylsilyl)-D-ribofuranosyl] - reverse transcriptase dimerization. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4834–4841.
- (41) Jacoby, E. M.; Schlichting, I.; Lantwin, C. B.; Kabsch, W.; Krauth-Siegel, R. L. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase - mepacrine complex. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1996**, *24* (1), 73–80. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199601\)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P).
- (42) Revuelto, A.; Ruiz-Santaquiteria, M.; de Lucio, H.; Gamo, A.; Carriles, A. A.; Gutiérrez, K. J.; Sánchez-Murcia, P. A.; Hermoso, J. A.; Gago, F.; Camarasa, M.J. Pyrrolopyrimidine vs imidazole-phenyl-thiazole scaffolds in nonpeptidic dimerization inhibitors of *Leishmania infantum* trypanothione reductase. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5* (6), 873–891. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00355>.

- (43) Lee, J. H.; Zhang, Q.; Jo, S.; Chai, S. C.; Oh, M.; Im, W.; Lu, H.; Lim, H. S. Novel pyrrolopyrimidine-based α -helix mimetics: cell-permeable inhibitors of protein-protein interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (4), 676–679. <https://doi.org/10.1021/ja108230s>.
- (44) de Lucio, H. Inhibición de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* mediada por peptidomiméticos de la hélice α 2 de la interfaz de dimerización, 2018. Universidad de Alcalá.
- (45) de Lucio, H.; Gamo, A. M.; Ruiz-Santaquiteria, M.; de Castro, S.; Sánchez-Murcia, P. A.; Toro, M. A.; Gutiérrez, K. J.; Gago, F.; Jiménez-Ruiz, A.; Camarasa, M. J. Improved proteolytic stability and potent activity against *Leishmania infantum* trypanothione reductase of α/β -peptide foldamers conjugated to cell-penetrating peptides. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *140*, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.032>.
- (46) Kima, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37* (10), 1087–1096. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007>.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2: NUEVOS DISRUPTORES DE LA DIMERIZACIÓN DE Li-TryR BASADOS EN UN ESQUELETO DE TRIAZOL-FENIL-TIAZOL

Tras los prometedores resultados obtenidos en el **Capítulo 1** con los proteomiméticos de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol, tanto en ensayos enzimáticos como en cultivo celular, en este **Capítulo 2** se planteó el diseño de nuevos disruptores no peptídicos de la dimerización de Li-TryR, con un esqueleto estructuralmente novedoso que pudiese dar lugar no sólo a inhibidores enzimáticos más potentes, sino también a agentes antileishmania más eficaces y selectivos.

Para ello, decidimos aplicar la estrategia de búsqueda de estructuras patrón o *scaffold hopping* y reemplazar el anillo de imidazol, por uno de 1,2,3-triazol. La aproximación de *scaffold hopping* parte de la premisa de que la actividad biológica de una determinada entidad química, puede ser exhibida de igual forma por otra entidad distinta con la que comparte determinadas características esenciales, aunque estructuralmente pueden considerarse diferentes.¹ Este concepto fue introducido por Schneider² en 1999 para referirse a una nueva estrategia, especialmente útil para la identificación de nuevas estructuras moleculares con actividad biológica, que podría ahorrar tiempo en la creación de librerías dirigidas de compuestos.

Las razones para aplicar la estrategia de *scaffold hopping* de cara al diseño de nuevas series de compuestos, están relacionadas habitualmente con un aumento de la solubilidad acuosa, un incremento de la estabilidad química y metabólica del prototipo, o incluso la búsqueda de una mayor rigidez estructural que pueda derivar en mayores afinidades por la diana. Adicionalmente a estas ventajas, el diseño de entidades químicas innovadoras mediante *scaffold hopping*, abre la puerta al descubrimiento de estructuras novedosas patentables que contribuyen a ampliar el espacio químico conocido, y que pueden representar una evolución hacia nuevos fármacos más eficaces.³

Existen numerosos ejemplos en la bibliografía del empleo exitoso de esta estrategia en la búsqueda de nuevos fármacos. Así, la aplicación de *scaffold hopping* sobre el fármaco comercial Diazepam™ con vistas a mejorar la farmacocinética y farmacodinámica del núcleo de benzodiazepina, permitió descubrir nuevos ligandos del receptor GABA_A comercializados posteriormente con el nombre de Zopiclona⁴, Zolpidem⁵ y Zaleplón⁶ (**Figura 2.1A**). El desarrollo de nuevos inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2 como Sulindaco, Celecoxib o Lumiracoxib⁷, diseñados a partir del antiinflamatorio no-esteroideo Indometacina⁸, representa otro ejemplo del empleo exitoso de esta estrategia (**Figura 2.1B**).

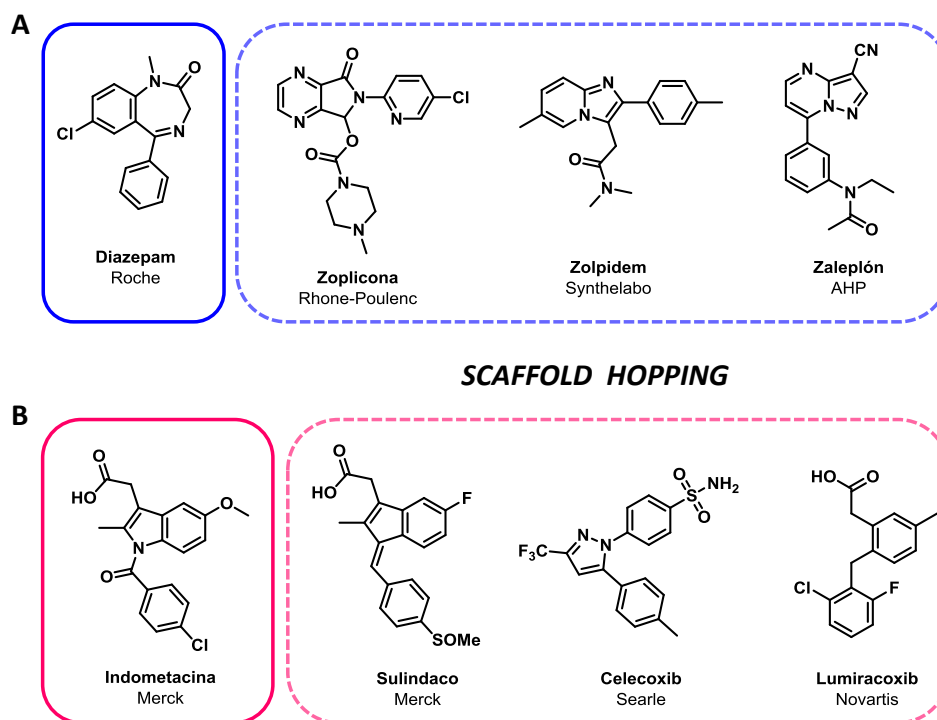


Figura 2.1. Ejemplos del empleo exitoso de la estrategia de *scaffold hopping*. Línea continua: estructura de referencia. Línea punteada: nuevos esqueletos; **A)** Ligandos que interaccionan en el sitio de unión de las benzodiazepinas sobre el receptor GABA_A; **B)** Inhibidores de ciclooxigenasa-2.

Teniendo en cuenta estas consideraciones y aplicando la estrategia de *scaffold hopping* sobre el esqueleto descrito de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol, decidimos sustituir el heterociclo de imidazol por una estructura privilegiada⁹⁻¹⁶ de 1,2,3-triazol que nos permitiría acceder a dos nuevas series de compuestos (**Figura 2.2**) basándonos en:

- a)** Novedad estructural del esqueleto de 5-6-5 triazol-fenil-tiazol (**Serie I**) y de sus sales de triazolio (**Serie II**), así como su accesibilidad sintética a partir de intermedios comunes con la serie del imidazol.
- b)** Posibilidad de explorar interacciones adicionales con la enzima mediante la introducción de un cuarto sustituyente **R₄** en el anillo de triazol (**Serie II**).
- c)** Mayor solubilidad acuosa del nuevo heterociclo debido al nitrógeno adicional que presenta con respecto al imidazol. Esta solubilidad además, se vería incrementada en el caso de las sales de triazolio (**Serie II**) como consecuencia de la carga positiva adicional del heterociclo alquilado.
- d)** Las propiedades fluorescentes de los nuevos esqueletos cromóforos y de su modulación mediante la introducción de sustituyentes directamente conjugados al núcleo central.

De este modo, tomando como referencia los compuestos de imidazol del **Capítulo 1**, y teniendo en cuenta las potenciales ventajas mencionadas anteriormente, en el **Capítulo 2** se ha llevado a cabo el diseño, síntesis y evaluación biológica de dos nuevas series de compuestos basados en un esqueleto de triazol-fenil-tiazol (**Serie I**) y sus sales de triazolio (**Serie II**),

diferentemente sustituidos en las posiciones R_1 , R_2 , R_3 y/o R_4 con el fin de obtener disruptores novedosos y más eficaces del proceso de dimerización de *Li-TryR*, con actividad leishmanicida potente y selectiva (**Figura 2.2**). Asimismo, se estudiarán las propiedades *druglike* y de fluorescencia de las dos nuevas series de compuestos comparándolas con las de los derivados de imidazol antecesores.

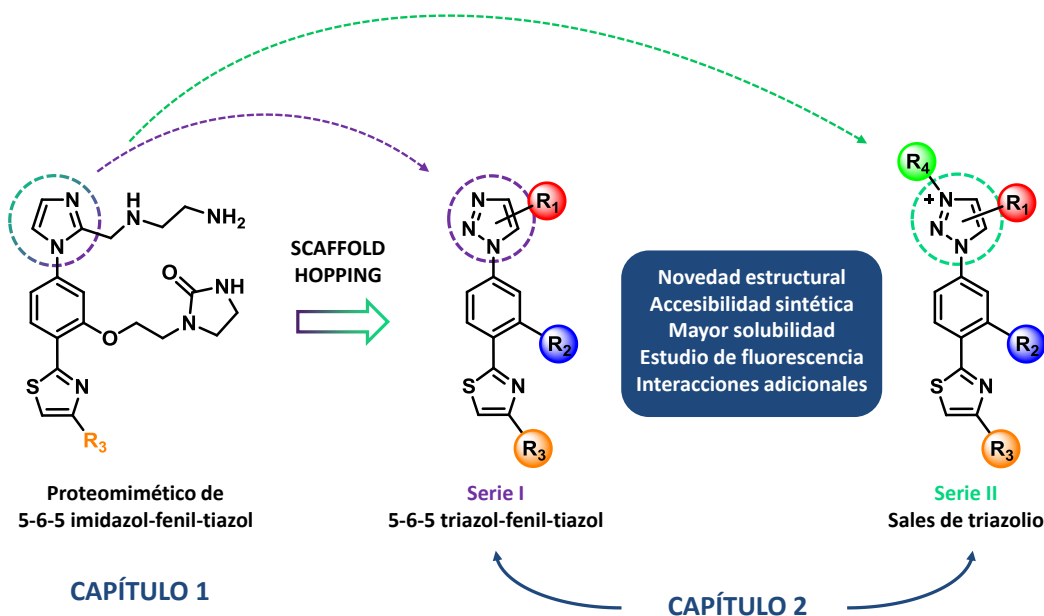


Figura 2.2. Diseño de los compuestos objetivo de este capítulo.

A continuación se recogen de manera detallada los resultados obtenidos.

2.1. Síntesis de triazol-fenil-tiazoles (Serie I)

2.1.1. Síntesis de una primera serie de compuestos de la Serie I

En primer lugar nos planteamos la preparación de una primera serie de triazol-fenil-tiazoles, portadores de los mismos sustituyentes alifáticos y/o aromáticos R_3 o muy similares a los de los derivados de imidazol anteriores (**Figura 2.3, a-f**), con el fin de comparar los resultados de actividad biológica obtenidos con ambos tipos de *scaffolds*.

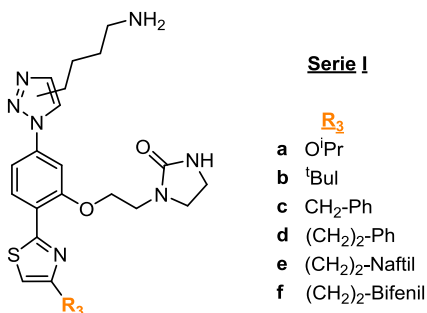
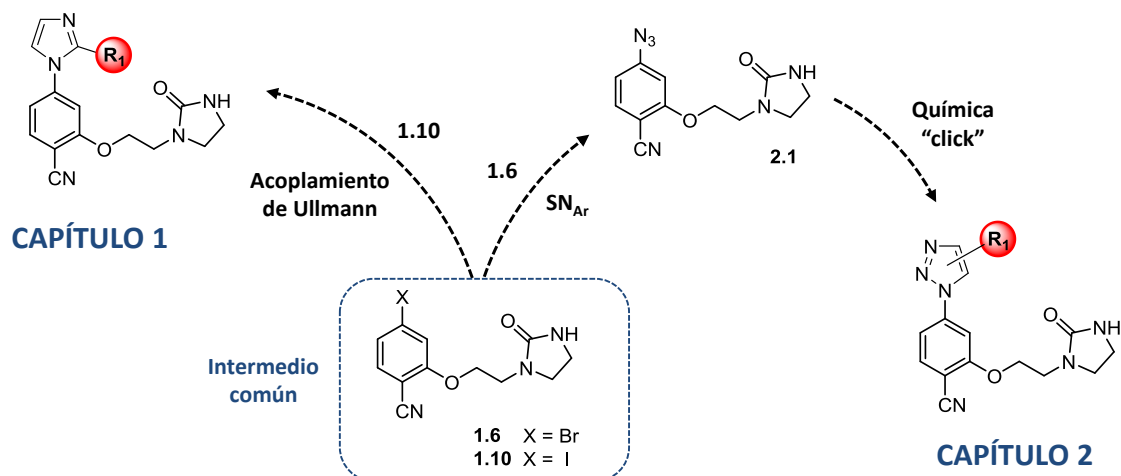


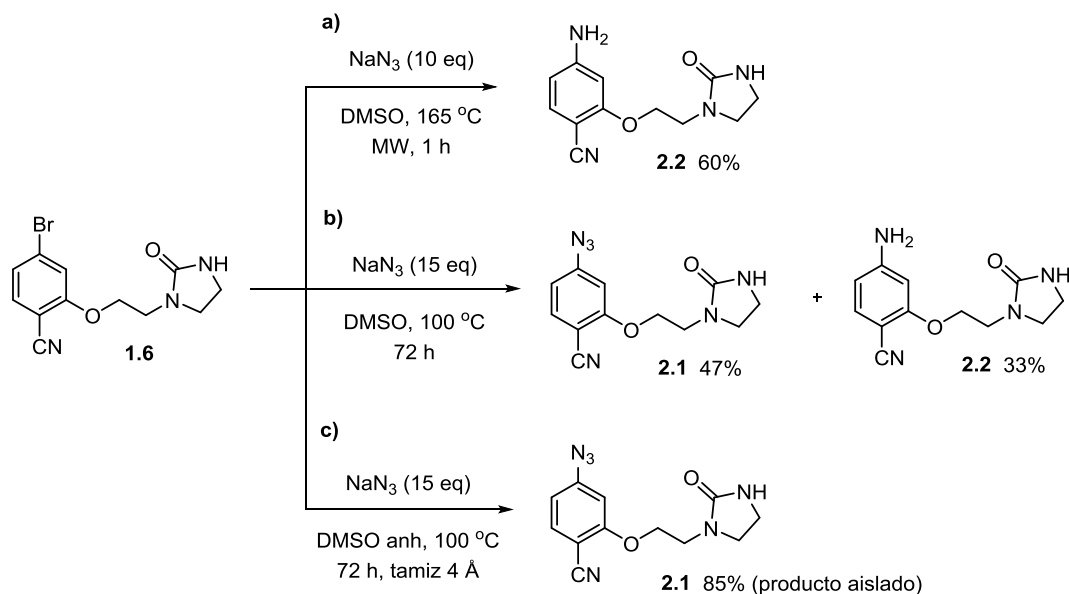
Figura 2.3. Primeros derivados de triazol-fenil-tiazol propuestos.

La variación de la ruta sintética para acceder a estos nuevos derivados de triazol se planteó tras la reacción de S_NAr que da lugar a los haluros de arilo **1.6** y **1.10**. En este caso y a diferencia de la síntesis de los 5-6-5 imidazol-fenil-tiazoles, no se llevaría a cabo un acoplamiento C-N de tipo Ullmann sobre el iodoareno **1.10**, sino que la síntesis se encaminaría hacia la obtención de triazoles mediante cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen (química “click”), empleando como intermedio sintético el bromoareno **1.6** a través de su azida derivada **2.1** (**Esquema 2.1**).



Esquema 2.1. Intermedio común para acceder a los compuestos de los Capítulos 1 y 2.

El primer paso dentro de la ruta sintética planteada consistió en la preparación del intermedio de azida **2.1** a partir del bromoareno **1.6** mediante una reacción de S_NAr con NaN_3 (**Esquema 2.2**).



Esquema 2.2. Optimización de la reacción de formación de la azida **2.1** a partir del bromoareno **1.6**.

Así, el tratamiento de **1.6** con 10 equivalentes de NaN_3 en DMSO a $165\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora, utilizando radiación de microondas siguiendo condiciones descritas¹⁷, no condujo al producto deseado **2.1** sino que dio lugar a la formación de la amina **2.2** en un 60% de rendimiento (**Esquema 2.2**). La formación de este producto podría explicarse a través de la sustitución del $-\text{Br}$ por el grupo $-\text{N}_3$, y posterior hidrólisis.

En vista de estos resultados, decidimos llevar a cabo un estudio de la reacción empleando diferentes condiciones y monitorizando el transcurso de la misma mediante HPLC-MS. Así, cuando el compuesto **1.6** se hizo reaccionar con NaN_3 en DMSO a temperaturas más bajas ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante 72 horas y sin radiación de microondas¹⁸ (**Esquema 2.2**), se observó la aparición de la azida **2.1** como producto mayoritario, junto con el producto de hidrólisis **2.2** en una proporción significativa. Cabe destacar que la dificultad de purificación cromatográfica del producto **2.1** en presencia de restos del producto de partida **1.6**, junto con la baja reactividad del $-\text{Br}$ en esta reacción, obligó a emplear exceso de NaN_3 además de temperaturas altas y tiempos de reacción largos, con vistas a agotar en la medida de lo posible el producto de partida. Finalmente, la utilización de tamiz molecular activado ($4\text{ }\text{\AA}$) como agente desecante, junto con el empleo de DMSO anhidro a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas, permitió minimizar la aparición del producto de hidrólisis **2.2** obteniéndose finalmente la azida deseada **2.1** con un 85% de rendimiento tras purificación cromatográfica (**Esquema 2.2**). La aparición del producto **2.2** pareció por tanto estar relacionada con la presencia de agua en el propio disolvente de reacción, ya que el empleo de tamiz molecular ($4\text{ }\text{\AA}$) como agente desecante permitió duplicar los rendimientos de la reacción.

En la **Figura 2.4** se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas de HPLC-MS representativos de las distintas condiciones de reacción utilizadas y de los productos presentes en el medio durante el estudio de optimización.

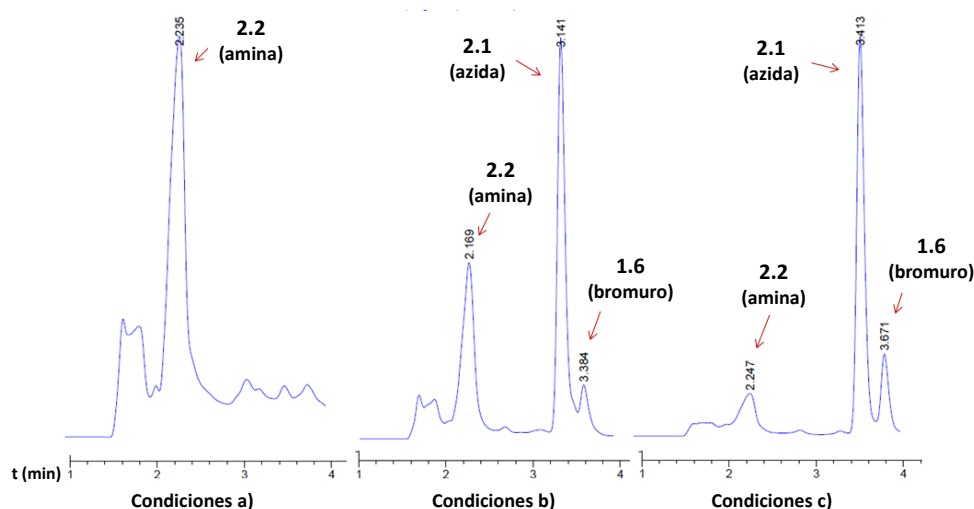
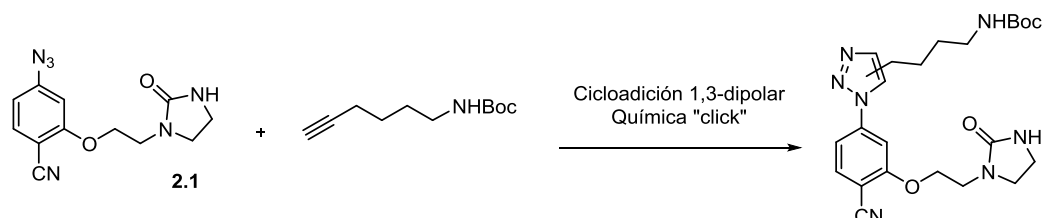


Figura 2.4. Cromatogramas de HPLC-MS representativos de las distintas condiciones empleadas. **Condiciones a):** NaN_3 (10 eq), DMSO, $165\text{ }^{\circ}\text{C}$, MW, 1h; **Condiciones b):** NaN_3 (15 eq), DMSO, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 72h; **Condiciones c):** NaN_3 (15 eq), DMSO anh, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 72 h, tamiz molecular $4\text{ }\text{\AA}$.

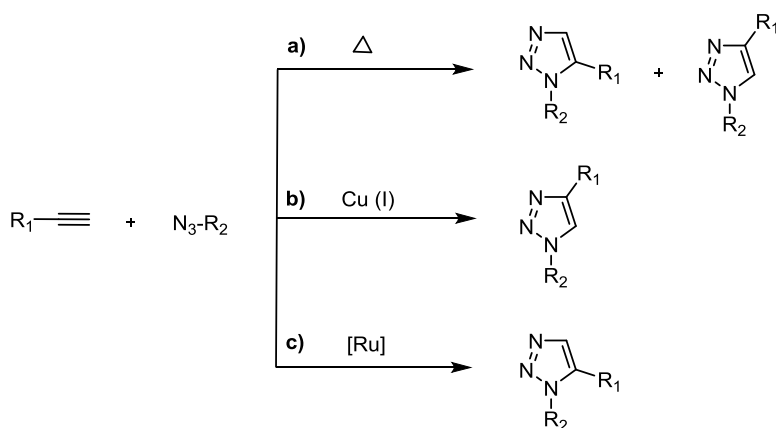
• **Reacción de cicloadición 1,3-dipolar**

La siguiente etapa sintética para la obtención del anillo de 1,2,3-triazol consistió en la cicloadición 1,3-dipolar o cicloadición de Huisgen entre la azida **2.1** y el alquino comercial hex-5-in-1-il carbamato de *terc*-butilo, portador de la cadena lateral de butilamina en **R₁** (**Esquema 2.3**).



Esquema 2.3. Síntesis del anillo de 1,2,3-triazol a partir del alquino comercial y la azida **2.1**.

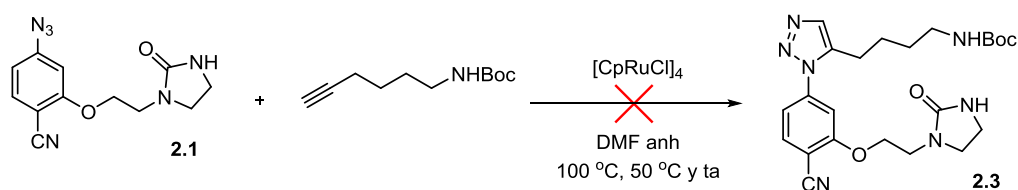
El mecanismo de reacción de la 1,3-cicloadición entre azidas y alquinos fue propuesto por Huisgen en 1967.¹⁹ Durante más de 40 años, las condiciones térmicas y los largos tiempos de reacción que se requieren para llevarla a cabo, junto con las complejas mezclas de regioisómeros -1,4 y -1,5 que se forman, limitó su aplicación de forma más extendida²⁰ (**Esquema 2.4**). En 2002 y de forma independiente, dos grupos de investigación publicaron como el empleo de sales de Cu (I) era capaz de acelerar la reacción por un factor de 10^7 incluso llevándola a cabo a temperatura ambiente, y lo que era más importante, observaron que la catálisis con cobre conducía directamente a la formación exclusiva del regioisómero-1,4^{21,22} (**Esquema 2.4**). Sin lugar a dudas, la cicloadición entre azidas y alquinos catalizada por cobre (*Copper (I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*, CuAAC o “química click”), es una de las reacciones más ampliamente utilizadas en el campo de la Química Médica debido a la oportunidad que ofrece para generar compuestos con potencial aplicación biológica. Por último, en el año 2005 Sharpless y colaboradores²³ describieron la posibilidad de obtener selectivamente el regioisómero-1,5 empleando nuevamente azidas y alquinos, usando en esta ocasión el complejo de $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ como catalizador (**Esquema 2.4**).



Esquema 2.4. Regioselectividad de la cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos.

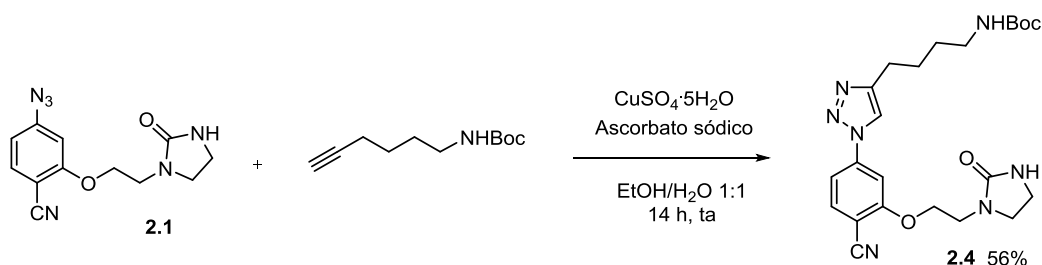
Con estas alternativas, nos planteamos en primer lugar la preparación del regioisómero-1,5 que dispondría la cadena lateral de butilamina en una posición similar a la de los compuestos de imidazol-fenil-tiazol **Capítulo 1**.

Sin embargo, los intentos de reacción entre el alquino hex-5-in-1-il carbamato de *terc*-butilo y la azida **2.1**, en presencia de $[\text{CpRuCl}]_4$ como catalizador a diferentes temperaturas (desde los 100 °C descritos²⁴ a temperatura ambiente), condujeron en todos los casos a la aparición de múltiples productos de descomposición que no pudieron ser aislados ni identificados, no detectándose en ningún caso la formación del producto deseado **2.3** (**Esquema 2.5**).



Esquema 2.5. Cicloadición 1,3-dipolar en presencia del catalizador $[\text{CpRuCl}]_4$.

En vista de las dificultades sintéticas encontradas en la obtención del regioisómero -1,5, decidimos centrarnos en la obtención del regioisómero -1,4 utilizando el sistema catalítico basado en Cu(I) ampliamente utilizado en la bibliografía²⁵ (**Esquema 2.6**).

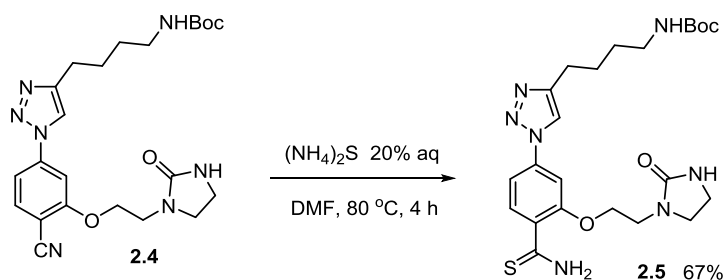


Esquema 2.6. Síntesis del regioisómero-1,4 **2.4** mediante CuAAC o química “click”.

Así, la reacción entre la azida **2.1** previamente sintetizada con el alquino comercial en presencia de Cu(I), generado *in situ* por reducción de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ con ascorbato sódico, y utilizando como disolvente una mezcla de EtOH/ H_2O 1:1 a temperatura ambiente durante 14 horas en ausencia de luz, condujo al triazol 1,4-disustituido **2.4** en un 56% de rendimiento.

- **Formación del anillo de tiazol: Síntesis de Hantzsch**

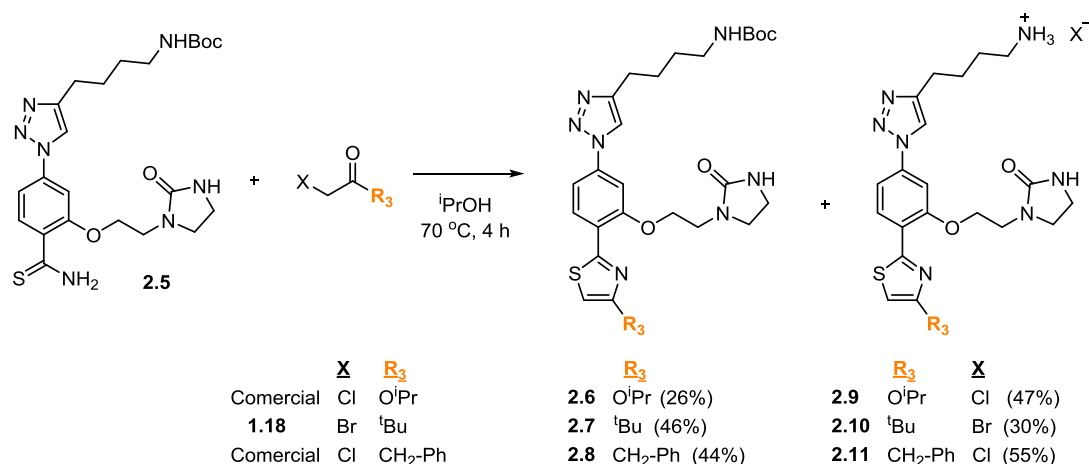
A continuación, con el objetivo de introducir variedad estructural en posición **R₃** mediante síntesis de Hantzsch de tiazoles, de manera idéntica a la serie del imidazol, se preparó en primer lugar la tioamida **2.5** por tionación del benzonitrilo **2.4** (**Esquema 2.7**).



Esquema 2.7. Síntesis de la tioamida **2.5** por tionación.

Esta reacción se llevó a cabo por tratamiento del benzonitrilo **2.4** con una disolución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ al 20% en DMF a 80 °C durante 4 horas, obteniéndose el producto deseado **2.5** en un rendimiento del 67% tras purificación cromatográfica.

Finalmente, se llevó a cabo la ciclación de Hantzsch entre la tioamida **2.5** y distintos reactivos α -halocarbonílicos alifáticos y aromáticos sencillos, idénticos o muy similares a los empleados inicialmente en la serie de los imidazoles (**Esquema 2.8**).



Esquema 2.8. Ciclación de Hantzsch a partir de la tioamida **2.5** para obtener los correspondientes tiazoles Boc-protectidos (**2.6 - 2.8**) y desprotectidos *in situ* (**2.9 - 2.11**).

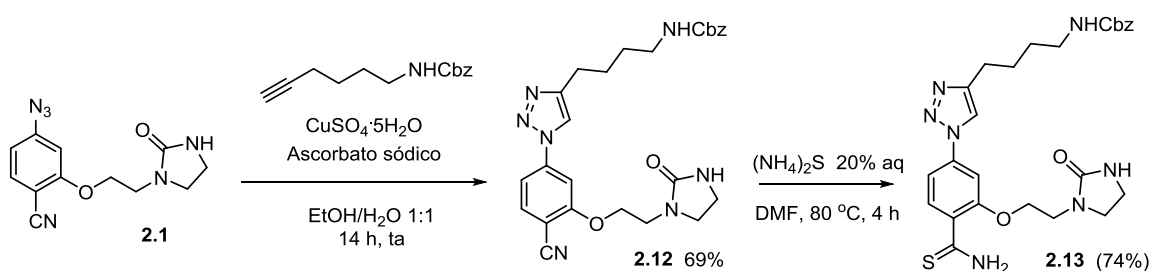
Así, la reacción entre el intermedio **2.5** y los correspondientes α -halocarbonilos comerciales y/o previamente sintetizados, en ⁱPrOH a 70 °C durante 4 horas, condujo en todos los casos a una mezcla resoluble cromatográficamente de tiazoles Boc-protectidos (**2.6 - 2.8**), y desprotectidos (**2.9 - 2.11**), con conversiones elevadas cercanas al 70%, y rendimientos moderados para ambos tipos de productos.

La explicación para la desprotección *in situ* del grupo -Boc, reside en el medio ácido (HX) generado en la reacción tras la ciclación del tiazol. Estos resultados contrastan sorprendentemente con la estabilidad del mismo grupo protector en la serie del imidazol descrita en el primer capítulo, donde no se había observado esta reacción secundaria. La

explicación de este hecho podría estar relacionada probablemente con el mayor impedimento estérico de los dos grupos -Boc presentes en la misma cadena de los derivados de imidazol. Los intentos de neutralización de este ácido mineral con una base débil como trietilamina, añadida inicialmente a la reacción, revirtieron la tioamida de partida a su nitrilo precursor. Por otro lado, a pesar de que podría considerarse incluso favorable la desprotección *in situ* para obtener los compuestos finales de la **Serie I** en una sola etapa, este grupo protector es necesario para poder llevar a cabo selectivamente la posterior reacción de alquilación del triazol y obtener las sales de triazolío de la **Serie II**.

A la vista de estos resultados, decidimos reemplazar el grupo protector Boc- por un grupo carbobenciloxi (Cbz), cuya desprotección no se realiza en medio ácido sino mediante hidrogenólisis, para la preparación de los derivados propuestos de fenetilo, naftilo y bifenilo.

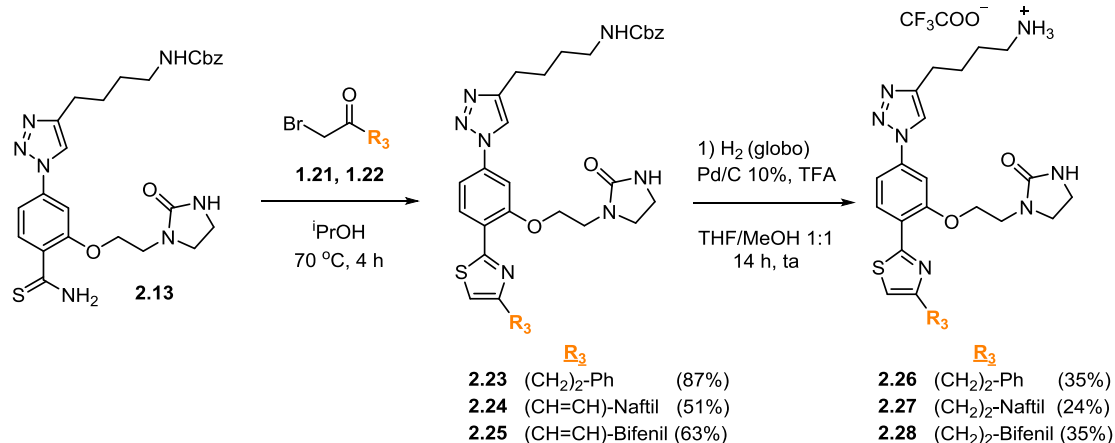
A partir de la azida intermedia **2.1** se llevó a cabo la reacción de acoplamiento 1,3-dipolar, en esta ocasión con el alquino portador del grupo amino protegido con -Cbz (**Esquema 2.9**).



Esquema 2.9. Síntesis de la tioamida **2.13** mediante “química click” seguido de tionación.

El acoplamiento de la azida intermedia **2.1** con el alquino comercial hex-5-in-1-il carbamato de bencilo, empleando nuevamente cobre como catalizador, dio lugar al triazol 1,4-disustituido **2.12** en un 69% de rendimiento. La posterior tionación empleando una disolución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ al 20% y calentando, permitió acceder a la tioamida **2.13** en un 74% de rendimiento.

A continuación, se llevó a cabo la síntesis de Hantzsch de tiazoles con las bromocetonas α,β -insaturadas sintetizadas previamente en el **Capítulo 1**, portadoras de sustituyentes aromáticos voluminosos de naftilo (**1.21**) y bifenilo (**1.22**) con espaciador de dos metilenos, y con la bromocetona comercial portadora del grupo fenetilo (**Esquema 2.10**).



Esquema 2.10. Síntesis de los derivados finales **2.26** - **2.28** de la **Serie I**.

De esta manera, la reacción de la tioamida **2.13** con la bromocetona comercial 1-bromo-4-fenilbutan-2-ona o con las bromocetonas sintetizadas **1.21** o **1.22**, dio lugar a los productos de ciclación de Hantzsch **2.23** - **2.25** con rendimientos comprendidos entre el 51 y el 87% (**Esquema 2.10**). Finalmente, el tratamiento de los intermediarios protegidos **2.23** - **2.25** con H₂ (globo), empleando Pd/C al 10% como catalizador y en presencia de ácido trifluoroacético (TFA), dio lugar a los compuestos finales de la **Serie I** **2.26** - **2.28** en forma de sales de trifluoroacetato tras purificación cromatográfica en fase inversa mediante Biotage™.

El doble enlace presente en los intermediarios **2.24** - **2.25**, se redujo al mismo tiempo en esta reacción obteniéndose el espaciador polimetilénico de dos eslabones saturado directamente, lo cual representa otra ventaja de este nuevo grupo protector. Por otro lado, el empleo de TFA en el medio de reacción permite protonar el grupo amino conforme se libera, evitando de esta manera la inactivación del catalizador.

Llegados a este punto y como se verá más adelante en la evaluación biológica, los resultados de inhibición enzimática obtenidos con los derivados de la **Serie I** **2.9** - **2.11** y **2.26** - **2.28** demostraron que estábamos ante disruptores de la dimerización de *Li*-TryR mucho más potentes que sus análogos de imidazol, por lo que nos planteamos la síntesis de nuevos derivados de triazol para estudios de relación estructura química - actividad biológica (*Structure-Activity Relationships*, SAR).

El compuesto **2.26** debido a su accesibilidad sintética, y el compuesto **2.28** por su potencia inhibitoria, fueron considerados como compuestos prototipo a partir de este momento para la optimización de los derivados.

2.1.2. Síntesis de nuevos derivados para estudios de SAR

- Síntesis de derivados truncados en el esqueleto

En primer lugar, para estudiar la importancia de los tres anillos que conforman el *scaffold* central en la actividad se decidió sintetizar los correspondientes derivados truncados de esqueleto del prototipo **2.26**, carentes de los heterociclos de triazol o tiazol y de sus respectivas cadenas laterales **R₁** y **R₃** (Figura 2.5).

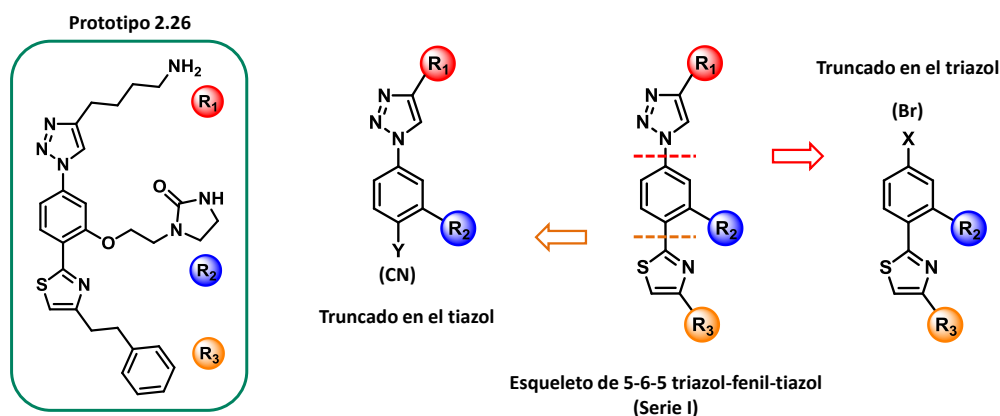


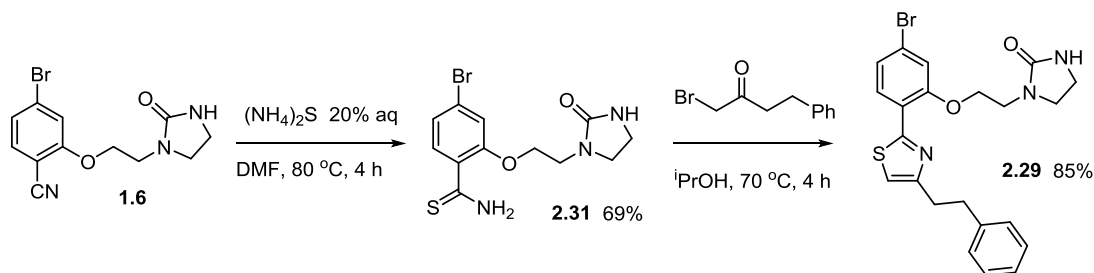
Figura 2.5. Estructura del compuesto de referencia **2.26** y de los compuestos truncados objetivo.

La principal dificultad en el diseño y síntesis de estos derivados truncados residió en la elección de los grupos **X** e **Y**, en función de su compatibilidad con la ruta sintética.

Para el diseño del derivado truncado en el triazol, se escogió como grupo funcional **X** un grupo -Br presente en uno de los intermedios y adecuado para la ciclación de Hantzsch. Como grupo **Y** se escogió el grupo funcional -CN y una estrategia de protección Boc del grupo amino. Como sustituyentes **R₁**, **R₂** y **R₃** se seleccionaron los grupos presentes en el prototipo **2.26** por su actividad biológica y por su mayor accesibilidad sintética.

Teniendo en cuenta estas premisas, se diseñó la síntesis de los derivados truncados **2.29** (Esquema 2.11) y **2.30** (Esquema 2.12) de la Serie I.

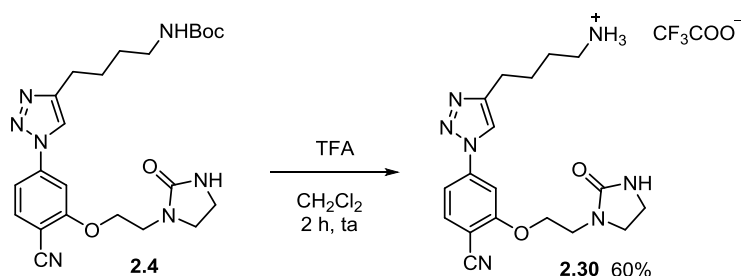
Para la síntesis del derivado truncado en el triazol **2.29**, se partió del bromuro intermedio **1.6** y se siguieron procedimientos de tionación y ciclación de Hantzsch análogos a los empleados en la síntesis de los derivados de la Serie I descritos anteriormente (Esquema 2.11).



Esquema 2.11. Síntesis del compuesto truncado **2.29** a partir del intermedio común **1.6**.

Así, el tratamiento del bromoareno **1.6** con una disolución acuosa de $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ al 20% en DMF a 80 °C, rindió la tioamida **2.31** en un 69% de rendimiento. La posterior ciclación de esta tioamida con la bromocetona comercial 1-bromo-4-fenilbutan-2-ona en $i\text{PrOH}$ a 70 °C, permitió obtener el derivado truncado final **2.29** en un 85% de rendimiento tras purificación cromatográfica por cromatografía circular centrífuga (CCTLC) en el Cromatotrón™.

Para la síntesis del derivado truncado en el anillo de tiazol **2.30** (**Esquema 2.12**), se decidió emplear el intermedio -Boc protegido **2.4** en vez de su análogo **2.12** protegido con Cbz, para evitar el uso de condiciones reductoras de hidrogenolisis incompatibles con el grupo -CN.



Esquema 2.12. Síntesis del compuesto truncado de tiazol desprotegido **2.30**.

Así, el tratamiento del intermedio protegido **2.4** con TFA en CH_2Cl_2 durante 2 horas, condujo al compuesto desprotegido **2.30** en forma de sal de trifluoroacetato en un 60% de rendimiento tras purificación en HPLC semipreparativo.

- **Modificaciones en R_1 y R_2**

Con el fin de evaluar la importancia de los sustituyentes R_1 y R_2 en la actividad biológica de los compuestos de triazol **2.26** y **2.28**, utilizados como referencia hasta el momento, nos planteamos llevar a cabo modificaciones en dichas posiciones.

En el caso de R_1 , se decidió estudiar la importancia del grupo amino y de la longitud del espaciador polimetilénico que conecta dicho grupo funcional con el anillo de triazol. Para ello, se planteó la síntesis de los compuestos truncados **2.32** - **2.36** donde el grupo funcional amino se sustituyó por un grupo -OH (**2.32**), se eliminó (**2.33** y **2.34**), o se redujo la longitud del espaciador a 3 eslabones (**2.35** y **2.36**) (**Figura 2.6**).

En el caso de R_2 decidimos eliminar la imidazolidinona original y reemplazarla por un grupo -OMe (**2.37** y **2.38**) (**Figura 2.6**). No nos planteamos más modificaciones debido al coste sintético que supone realizar modificaciones en esta posición por tratarse del sustituyente que se introduce en la primera etapa de la síntesis.

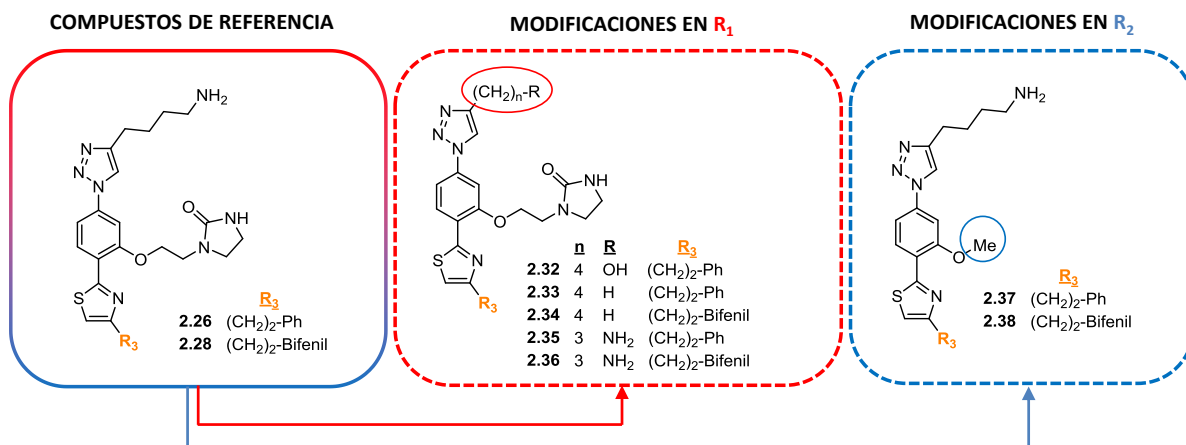
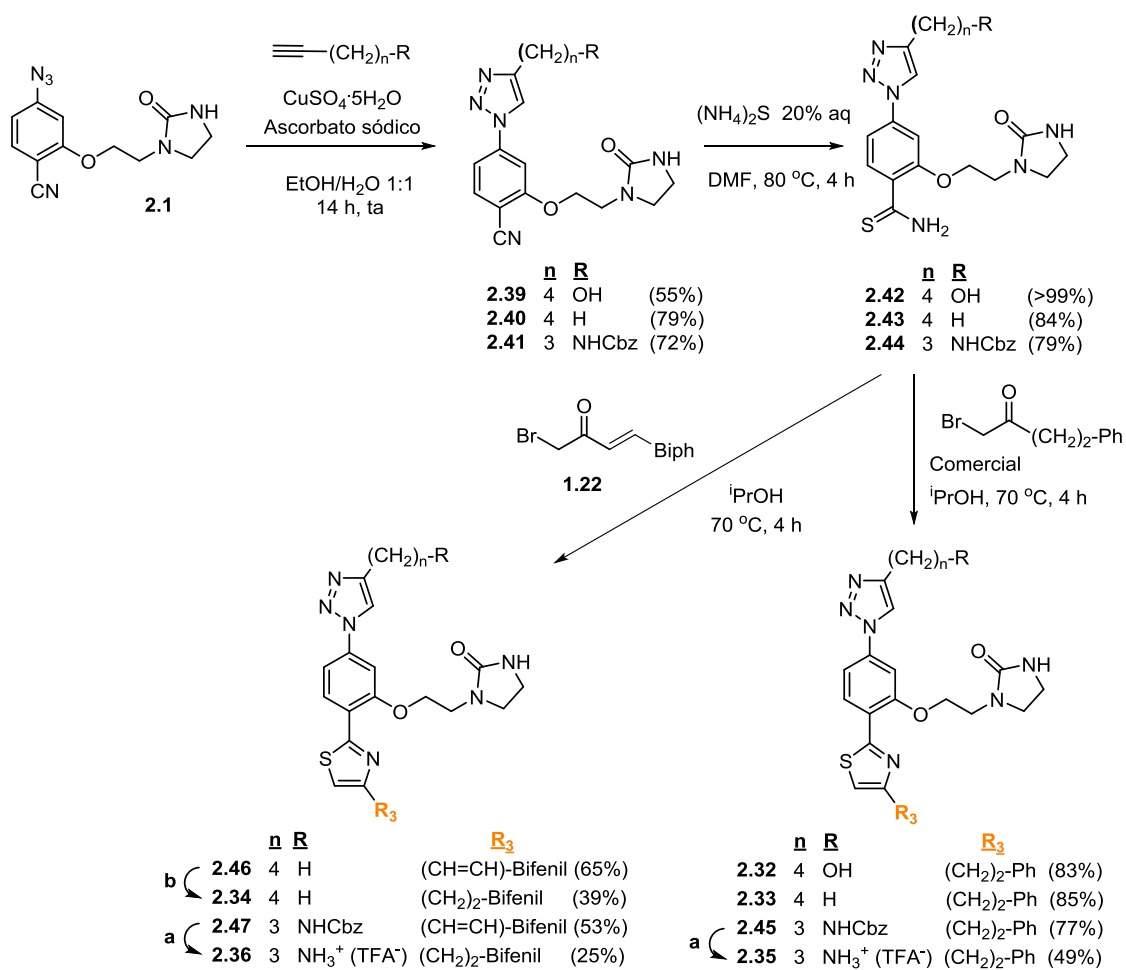


Figura 2.6. Compuestos objetivo 2.32 - 2.38 con modificaciones en R₁ y R₂ propuestos.

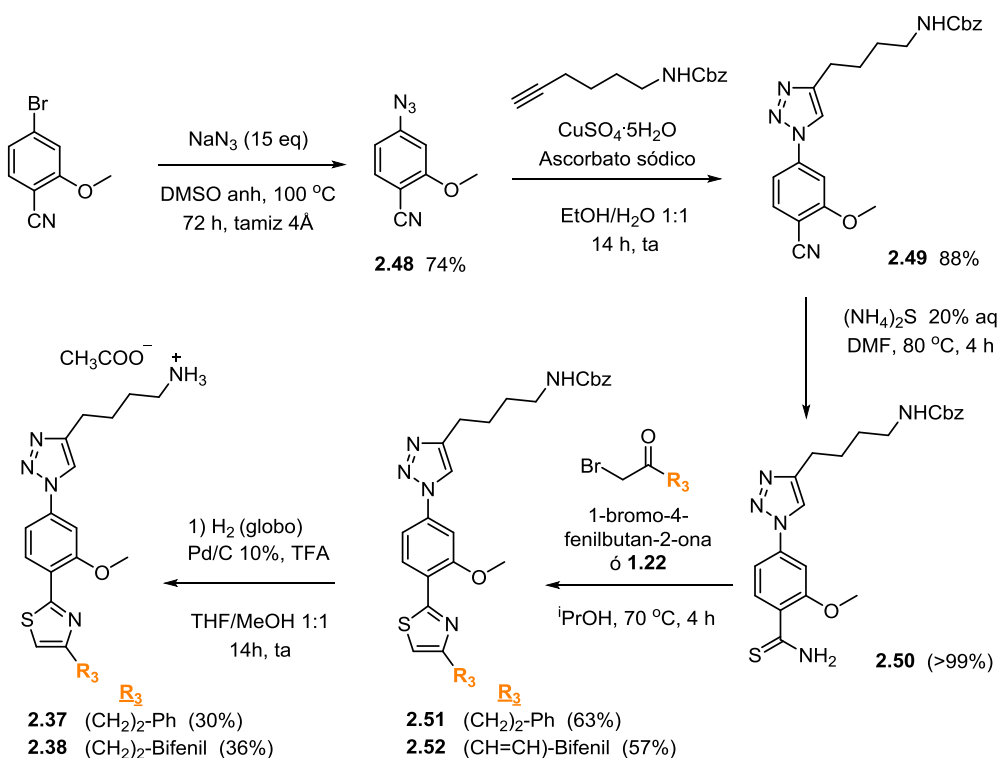
Para la síntesis de los derivados modificados en R₁ se partió de la azida intermedia 2.1, empleando diferentes alquinos en la reacción de cicloadición 1,3-dipolar. En el **Esquema 2.13** se detalla la ruta sintética empleada para la obtención de los derivados 2.32 - 2.36 propuestos.



Esquema 2.13. Síntesis de los derivados modificados en R₁ 2.32 - 2.36. Condiciones **a**: H₂ (globo), Pd/C 10% en THF/MeOH 1:1 y TFA, 14 h; Condiciones **b**: H₂ (globo), Pd/C 10% en THF/MeOH 1:1 y TFA, 2 h.

La reacción entre los alquinos comerciales correspondientes y la azida **2.1**, en una mezcla de EtOH/H₂O 1:1 empleando cobre (I) como catalizador y ascorbato de sodio como agente reductor, permitió obtener los triazoles **2.39** - **2.41** con rendimientos comprendidos entre el 55 y el 79%. La posterior tionación del grupo nitrilo con una disolución acuosa de (NH₄)₂S al 20% en DMF a 80 °C, dio lugar a las tioamidas **2.42** - **2.44** con buenos rendimientos, incluso cuantitativos en el caso de **2.42**. A continuación, llevamos a cabo por un lado la ciclación entre dichas tioamidas con la bromocetona comercial 1-bromo-4-fenilbutan-2-ona, obteniéndose los derivados modificados finales **2.32** y **2.33** con rendimientos superiores al 80%, así como el intermedio de propilamina protegido **2.45** en un 77% de rendimiento. La hidrogenolisis de este último empleando Pd/C al 10% como catalizador en presencia de TFA, permitió obtener el derivado desprotegido final **2.35** en un 49% de rendimiento tras purificación en fase inversa en el Biotage™. Por otro lado, la reacción de Hantzsch entre las tioamidas **2.43** y **2.44** con la bromocetona de bifenilo previamente sintetizada **1.22**, dio lugar a los intermedios **2.46** y **2.47** con rendimientos del 65 y 53% respectivamente. Por último, la reducción del doble enlace de **2.46** con H₂ y Pd/C como catalizador durante 2 horas, permitió acceder al compuesto final **2.34** en un 39% de rendimiento, mientras que la hidrogenolisis del precursor protegido **2.47** en las condiciones habituales de desprotección, condujo al derivado de propilamina **2.36** en un 25% tras purificación por cromatografía en fase inversa (**Esquema 2.13**).

Para la síntesis de los derivados modificados en **R₂** **2.37** y **2.38**, se partió de 4-bromo-2-metoxibenzonitrilo y se llevaron a cabo las reacciones que se muestran en el **Esquema 2.14**.



Esquema 2.14. Síntesis de los derivados **2.37** y **2.38** modificados en **R₂**.

De esta manera, el tratamiento del bromuro comercial, 4-bromo-2-metoxibenzonitrilo, con un amplio exceso de NaN_3 calentando a $100\text{ }^\circ\text{C}$ durante tres días en DMSO anhidro, condujo a la azida intermedia **2.48** en un 74% de rendimiento tras purificación cromatográfica. La posterior cicloadición con el alquino comercial adecuado mediante química “click”, seguido de tionación con $(\text{NH}_4)_2\text{S}$, dio lugar a la tioamida **2.50** con muy buenos rendimientos. Seguidamente, el tratamiento de dicha tioamida con la bromocetona comercial 1-bromo-4-fenilbutan-2-ona o con la bromocetona sintetizada **1.22**, permitió obtener los tiazoles **2.51** y **2.52** en un 63 y 57% de rendimiento, respectivamente. Finalmente, la hidrogenolisis de los intermedios **2.51** y **2.52** con H_2 (globo) empleando Pd/C 10% como catalizador en presencia de TFA, permitió acceder a los compuestos finales **2.37** y **2.38** en un 30 y 36% de rendimiento respectivamente tras purificación cromatográfica en fase inversa en el Biotage™.

- **Nuevas modificaciones en R_3**

Como se ha mencionado anteriormente, los datos biológicos de los primeros derivados de la **Serie I**, portadores de diferentes sustituyentes en R_3 , indicaban que la introducción de grupos poliaromáticos de naftaleno (**2.27**) o bifenilo (**2.28**) unidos a través de un espaciador de dos metilenos, mejoraban enormemente la inhibición enzimática tanto en el ensayo de actividad como en el de dimerización con respecto a los derivados menos hidrófobos (**2.9** - **2.11** o **2.26**). Sin embargo, el aumento de hidrofobicidad asociado a la mejora de la actividad iba acompañado de una menor solubilidad en agua de los compuestos, lo que dificultaba los ensayos biológicos. Por ese motivo, nos planteamos introducir nuevos sustituyentes heterocíclicos fusionados (**2.54** - **2.56**) que pudieran equilibrar la hidrofobicidad necesaria para la inhibición, con una buena solubilidad acuosa fruto de la introducción de heteroátomos (**Figura 2.7**). Asimismo, se estudió también la introducción de espaciadores más largos en el sustituyente R_3 (**2.53**) (**Figura 2.7**).

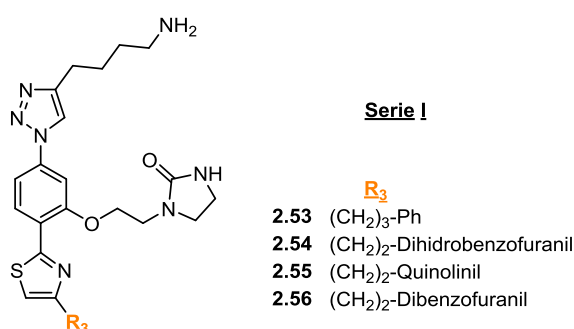
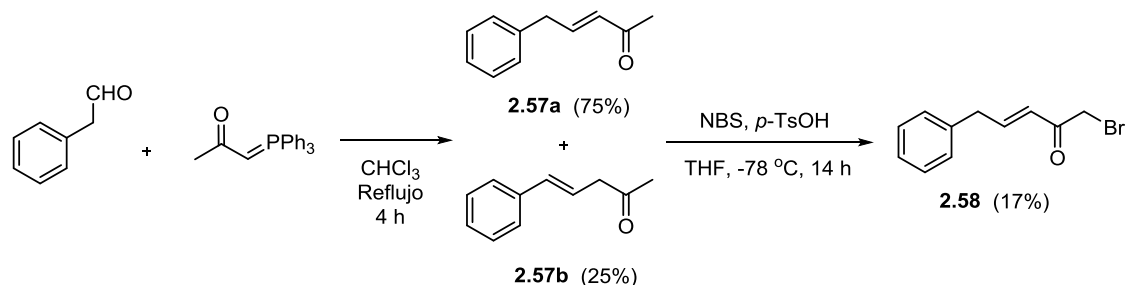


Figura 2.7. Compuestos objetivo **2.53** - **2.56** con nuevas modificaciones en R_3 .

Como se puso de manifiesto en el **Capítulo 1**, la introducción de variedad estructural en la posición R_3 del *scaffold* viene limitada por la disponibilidad comercial o por la capacidad de sintetizar las bromocetonas α,β -insaturadas necesarias para la síntesis de Hantzsch de tiazoles.

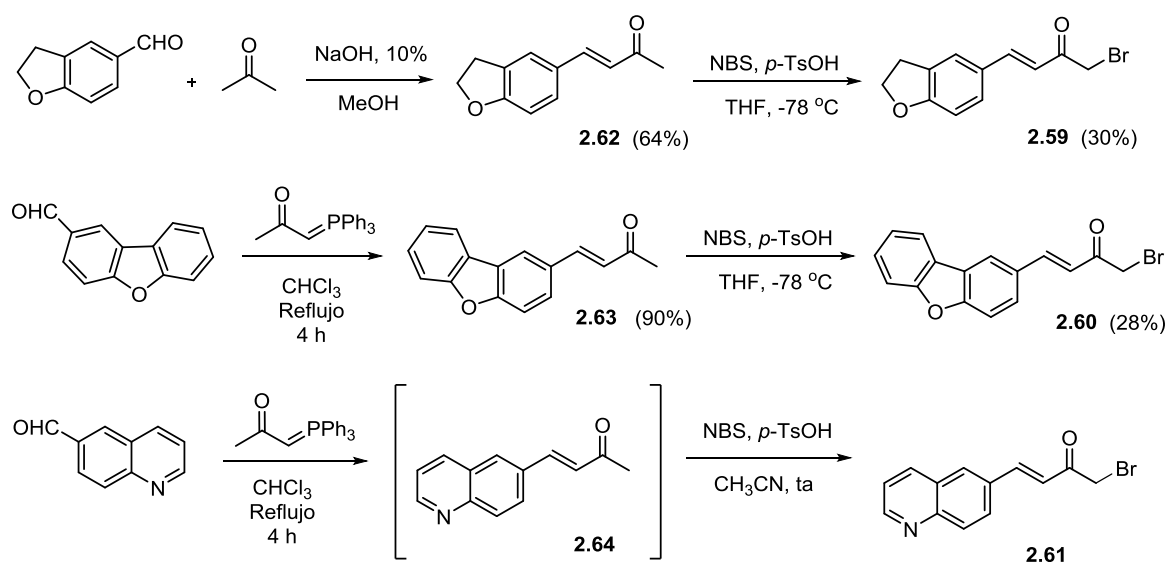
En primer lugar, con el objetivo de determinar la longitud óptima del espaciador entre el tiazol y el grupo aromático, se sintetizó la bromocetona α,β -insaturada **2.58** portadora de un espaciador de tres metilenos (**Esquema 2.15**).



Esquema 2.15. Síntesis de la bromocetona **2.58** portadora de un espaciador de 3 metilenos.

Para ello se llevó a cabo una reacción de Wittig entre el fenilacetaldehído y el yloro estabilizado de acetona comercial en CHCl_3 a reflujo durante 4 horas, que condujo a una mezcla irresoluble cromatográficamente de regioisómeros (**2.57a** y **b**), consecuencia de la deshidratación del alcohol intermedio hacia dos posiciones favorecidas por la conjugación final del doble enlace. En el espectro de ^1H RMN pudo determinarse una proporción de 75/25 entre ambos isómeros, siendo mayoritario el que tenía el doble enlace conjugado con el carbonilo (**2.57a**). La posterior bromación de la mezcla con NBS, permitió aislar únicamente la bromocetona **2.58** del isómero mayoritario en un bajo rendimiento del 17%.

A continuación, se sintetizaron las bromocetonas α,β -insaturadas portadoras de heterociclos fusionados **2.59** - **2.61** como se describe en el **Esquema 2.16**.



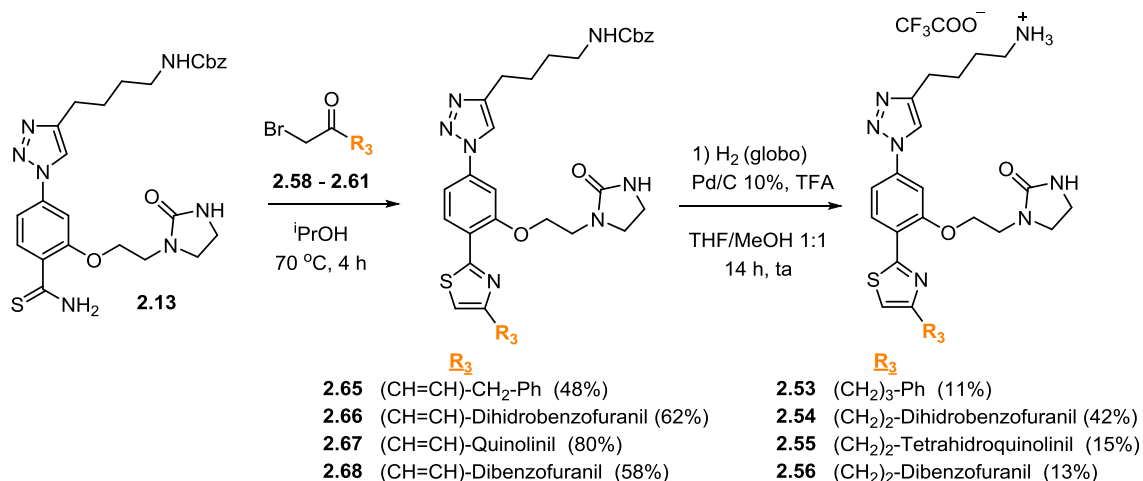
Esquema 2.16. Síntesis de la bromocetonas **2.59** - **2.61** mediante bromación con NBS a -78°C o ta de las cetonas previamente sintetizadas mediante condensación aldólica (**2.59**) o Wittig (**2.60** y **2.61**).

La condensación aldólica entre el aldehído del 2,3-dihidrobenzofurano con acetona en MeOH, empleando como base una disolución acuosa de NaOH al 10%, permitió obtener la cetona α,β -insaturada **2.62** en un 64% de rendimiento. Los análogos de dibenzofurano y quinolina **2.63** y **2.64**, se obtuvieron por reacción de Wittig de los aldehídos correspondientes con el iluro estabilizado de acetona en cloroformo a reflujo. El compuesto **2.64** no se pudo aislar con un grado de pureza adecuado tras purificación cromatográfica, y se utilizó en la siguiente reacción sin posterior purificación, mientras que la cetona **2.63** se obtuvo en un 90% de rendimiento tras purificación cromatográfica (**Esquema 2.16**).

Posteriormente, para la bromación de las metilcetonas de heterociclos π -excedentes (**2.62** y **2.63**) fue necesario emplear bajas temperaturas ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y THF como disolvente) con el fin de bromar selectivamente la posición enólica terminal sin dar lugar a bromaciones en el heterociclo. Siguiendo este procedimiento se sintetizaron las bromocetonas con heterociclos oxigenados **2.59** y **2.60**, en un 30% y 28% respectivamente.

En cambio, la bromación de metilcetonas con anillos π -deficientes (**2.64**) con NBS en presencia de *p*-TsOH, se pudo llevar a cabo a temperatura ambiente en CH_3CN sin competencia con la bromación del heterociclo obteniéndose el derivado de quinolina **2.61** que se empleó sin purificación previa en la siguiente etapa de reacción.

Una vez sintetizadas las α -bromocetonas terminales correspondientes y tal y como se indica en el Esquema 2.17, se obtuvieron los compuestos finales **2.53** - **2.56** mediante síntesis de Hantzsch de tiazoles y posterior tratamiento con H_2 , Pd/C en medio ácido a partir de la tioamida Cbz-prottegida **2.13** como producto de partida.

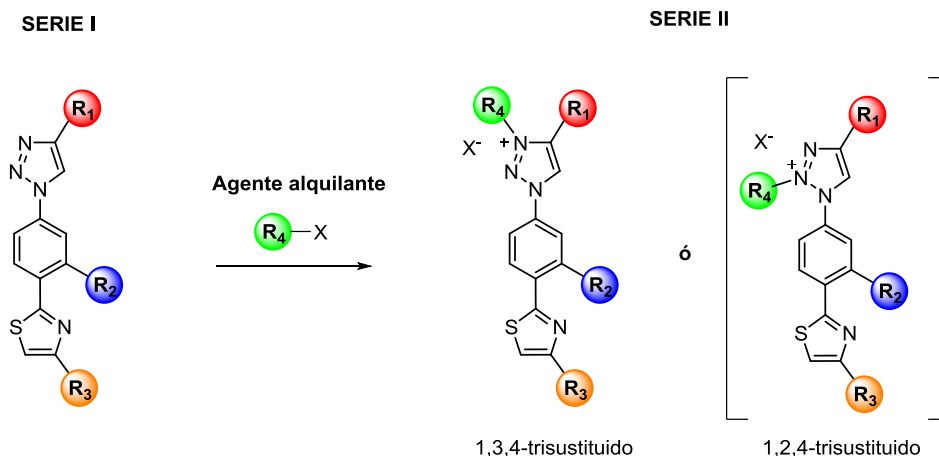


Esquema 2.17. Preparación de los compuestos finales **2.53** - **2.56** mediante síntesis de Hantzsch de tiazoles y posterior desprotección.

Cabe mencionar que la hidrogenación del derivado de quinolina **2.67** dio lugar al anillo de tetrahydroquinolina en **R₃** (**2.55**), consecuencia de la desaromatización parcial del heterociclo.

2.2. Síntesis de sales de triazolio-fenil-tiazol (Serie II)

Dentro de la estrategia de *scaffold hopping* utilizada para el diseño de estos nuevos inhibidores (**Serie I**) de *Li-TryR*, el heterociclo de 1,2,3-triazol como se ha comentado al inicio de este capítulo ofrecía la posibilidad de alquilación para dar lugar a una nueva serie de sales de 1,2,3-triazolio portadoras de un cuarto sustituyente R_4 en el *scaffold* (**Serie II**), cuya síntesis y estudio nos planteamos a continuación (**Esquema 2.18**).



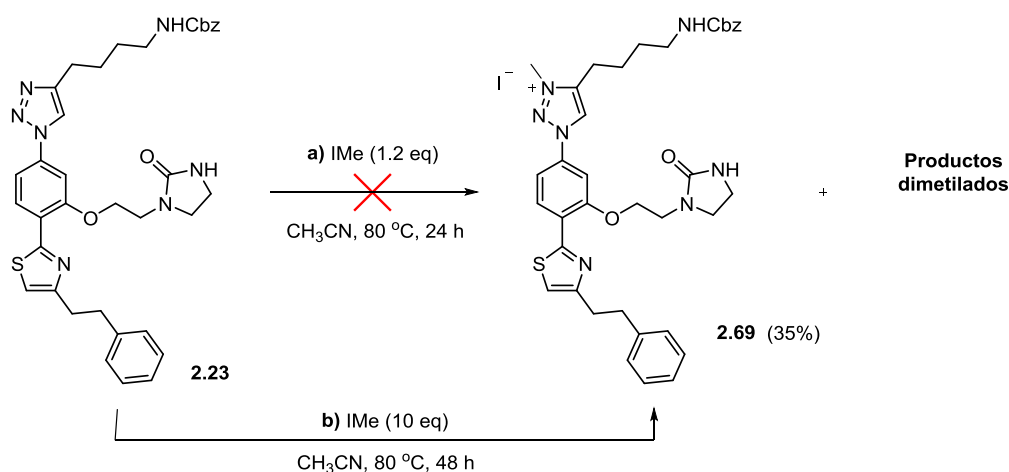
Esquema 2.18. Posibilidad de alquilación de los compuestos de la **Serie I**.

Las sales de triazolio se encuentran habitualmente en el campo de la química de materiales donde su uso como líquidos iónicos (*Ionic Liquids*, ILs), tal vez sea una de las aplicaciones más conocidas.²⁶⁻²⁹ No obstante, esta estructura química también se ha utilizado en el campo de la Química Médica ya que forma parte, entre otros ejemplos, de agentes anticancerosos^{30,31} o incluso de compuestos con actividad antiproliferativa frente a distintas especies de *Leishmania*.³²

Desde un punto de vista sintético, las sales de 1,2,3-triazolio trisustituidas tienen la ventaja fundamental de poder ser obtenidas fácilmente a partir del heterociclo neutro, mediante reacciones de N-alquilación empleando diferentes reactivos alquilantes como haluros de alquilo o tosilatos. La regioselectividad de la reacción es una variante a tener en cuenta en la alquilación, debido a la posibilidad de obtener tanto el producto 1,2,4- como el 1,3,4-trisustituido (**Esquema 2.18**). La naturaleza del agente alquilante y el impedimento estérico de las posiciones del triazol, juegan un papel fundamental en la selectividad de la reacción, siendo la funcionalización en N3 mucho más favorable que en N2.³³

2.2.1. Estudio de la reacción de alquilación

Para estudiar la reacción de alquilación de los compuestos de triazol de la **Serie I**, decidimos emplear como producto de partida el intermedio Cbz-prottegido **2.23** y distintos agentes de alquilación sencillos ($R_4 = \text{Me}$) como yoduro de metilo.



Esquema 2.19. Reacción de alquilación con IMe del intermedio protegido **2.23**.

Los estudios de RMN 1D-NOESY (**Figura 2.8A**) y HMBC (**Figura 2.8B**), confirmaron inequívocamente la metilación de la posición N3 del triazol, tal y como había esperar de acuerdo con la bibliografía.³³

En el experimento de NOESY (**Figura 2.8A**) se pudo observar como la saturación de la señal correspondiente al nuevo metilo a 4.42 ppm (H21), mostró el acoplamiento dipolar espacial con las señales correspondientes a los protones H10, H13, H16 o H17, indistinguibles *a priori* en el espectro de ^1H RMN por presentar isocronía accidental entre ellos, por lo que no se pudo confirmar de manera inequívoca la alquilación en el anillo de triazol. No obstante y de manera complementaria, el experimento de HMBC (**Figura 2.8B**) permitió observar la correlación entre los protones H21 del nuevo metilo y el carbono cuaternario C13 del triazol, situado a tres enlaces de distancia de dichos protones y que también correlaciona con los protones H11 de la cadena de butilamina, lo que sí permitió confirmar la metilación del N3 del triazol.

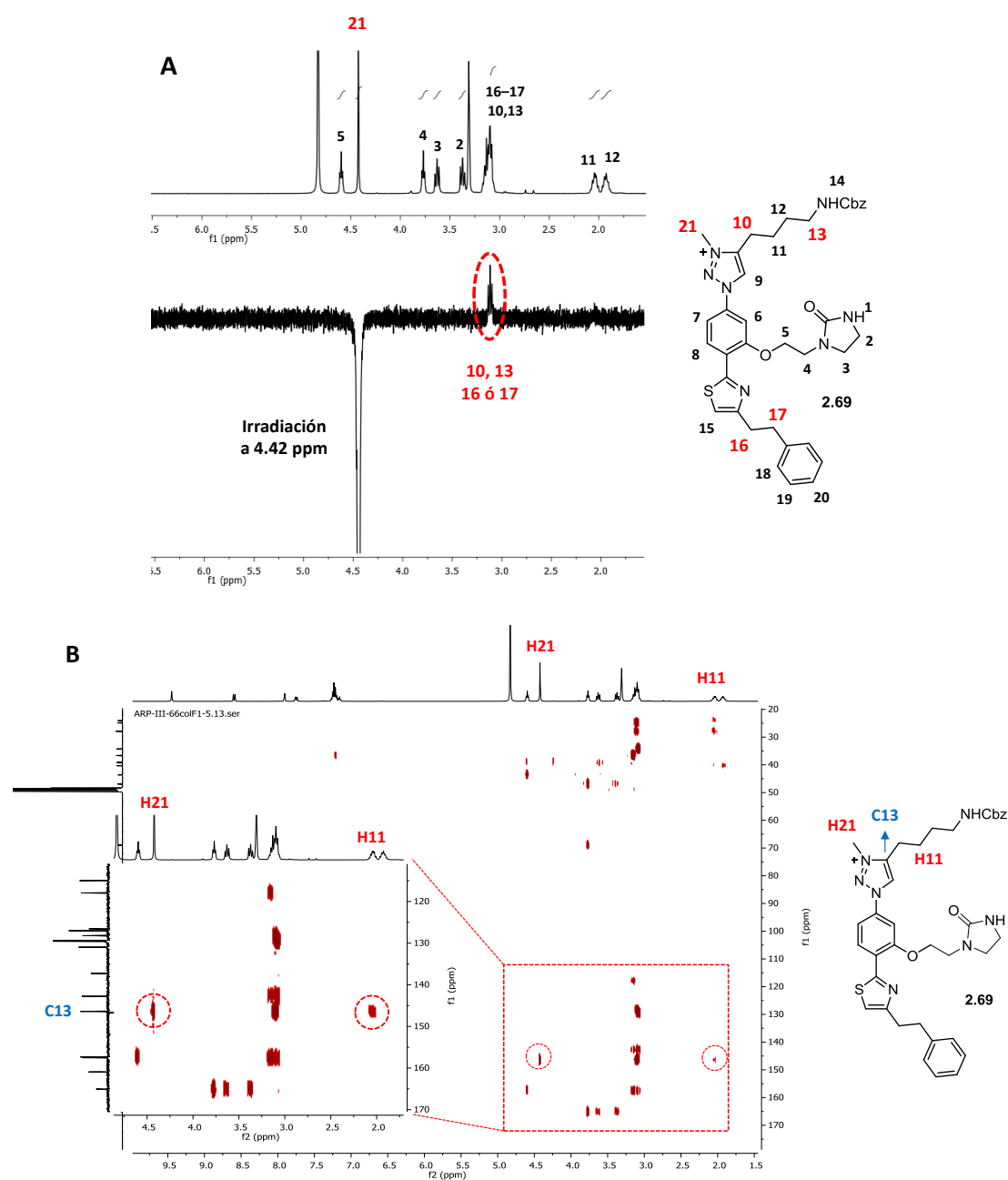
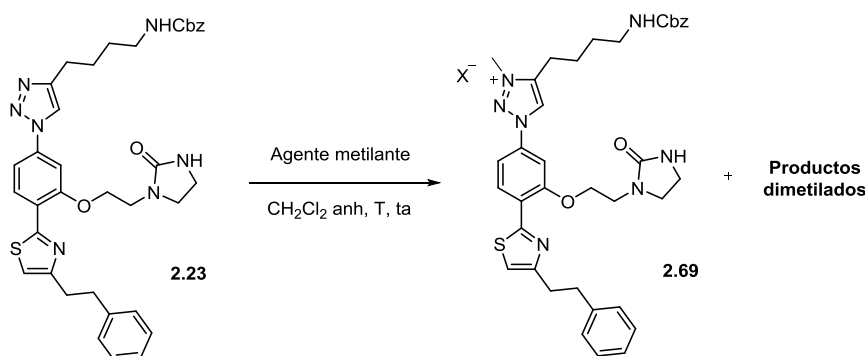


Figura 2.8.A) Experimento 1D NOESY irradiando el CH₃ a 4.42 ppm y comparación con el ¹H RMN; **B)** Espectro bidimensional de HMBC.

Una vez confirmada la regioselectividad y con el fin de optimizar la reacción de alquilación llevamos a cabo un estudio en profundidad con diferentes agentes metilantes como tetrafluoroborato de metilo (Me₃OBF₄)³⁴ o trifluorometanosulfonato (triflato) de metilo (MeOTf)³⁵, y distintas condiciones de reacción. Los resultados de este proceso de optimización se recogen en la **Tabla 2.1**. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante HPLC observándose tanto la formación del producto monometilado deseado **2.69**, como productos de dimetilación no caracterizados y producto de partida **2.23** sin reaccionar.

Tabla 2.1. Optimización de la reacción de metilación de **2.23** con diferentes agentes alquilantes y diferentes tiempos de reacción en CH₂Cl₂ a temperatura ambiente.



Entrada	Agente alquilante	t (h)	Conversión (%) ^b	Rdto 2.69 (%) ^b	Rdtos dimetilados (%) ^b
1	Me ₃ OBf ₄	1	78	50	10
2	Me ₃ OBf ₄	5	90	54	17
3	MeOTf	1	100	80	12
4	MeOTf	0.25	100	91	6

^a CH₃CN a 80 °C; ^b Conversiones y rendimientos determinados por HPLC.

El tratamiento del triazol **2.23** con 1.2 equivalentes de Me₃OBf₄ en CH₂Cl₂ anhidro a temperatura ambiente (**entrada 1**), condujo a la formación del producto monometilado **2.69** en un 50% de rendimiento determinado por HPLC al cabo de una hora, y no evolucionó significativamente más con el paso del tiempo (**entrada 2**). La reacción en las mismas condiciones con MeOTf (1.2 eq), fue significativamente más rápida ya que consumió completamente el producto de partida al cabo de una hora, detectándose el producto monometilado **2.69** en un 80% de rendimiento (**entrada 3**).

Las buenas conversiones obtenidas con el MeOTf, junto con la velocidad y la selectividad de reacción logradas en esas condiciones, nos llevaron a optimizar los tiempos de reacción con este agente metilante explorando tiempos inferiores a una hora. Finalmente, el empleo de 1 equivalente de MeOTf durante 15 minutos en CH₂Cl₂ anhidro a temperatura ambiente (**entrada 4**), se estableció como las condiciones idóneas para la metilación del triazol.

En la **Figura 2.9** se muestran a modo de ejemplo los espectros de HPLC más representativos del estudio de optimización de la reacción de alquilación.

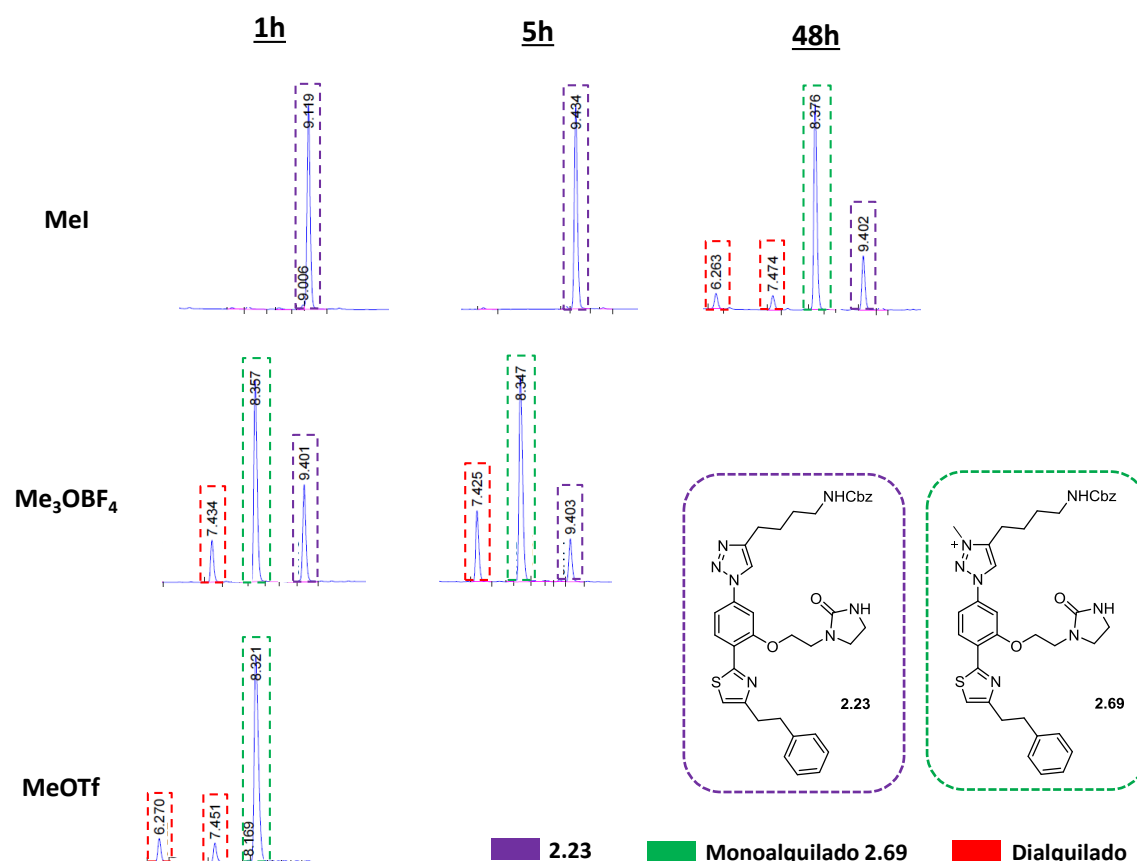


Figura 2.9. Cromatogramas HPLC obtenidos a distintos tiempos en la reacción de metilación de **2.23** con diferentes agentes alquilantes.

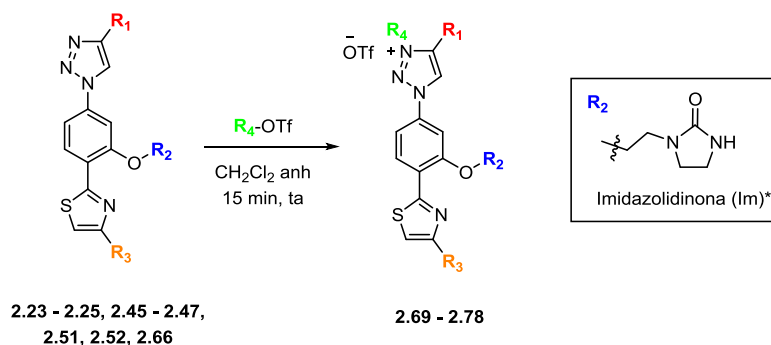
Una vez determinadas las condiciones de reacción óptimas, decidimos llevar a cabo la síntesis de una pequeña quimioteca de derivados alquilados a partir de intermedios comunes con la **Serie I**, modificando las posiciones **R₁**, **R₂**, **R₃** y/o **R₄** de cara realizar estudios SAR de esta nueva serie y comparar con la anterior.

2.2.2. Síntesis de derivados de la **Serie II** modificados en **R₁**, **R₂**, **R₃** y **R₄**

La síntesis de las sales de triazolio protegidas **2.69** - **2.78** de la **Serie II** se realizó por alquilación con los triflatos de alquilo correspondientes, bajo las condiciones de alquilación optimizadas en el apartado anterior. En la **Tabla 2.2** se recogen los rendimientos de los compuestos alquilados intermedios obtenidos tras purificación cromatográfica.

Como puede observarse en la reacción de alquilación con MeOTf, los compuestos se obtuvieron con buenos rendimientos, superiores al 70% en todos los casos, mientras que la alquilación con EtOTf dio lugar a rendimientos más bajos (compuesto **2.72**, rendimiento = 45%).

Tabla 2.2. Síntesis de los compuestos protegidos de la **Serie II** (**2.69 - 2.78**) a partir de intermedios de la **Serie I** mediante alquilación con distintos triflatos en las condiciones optimizadas anteriores.



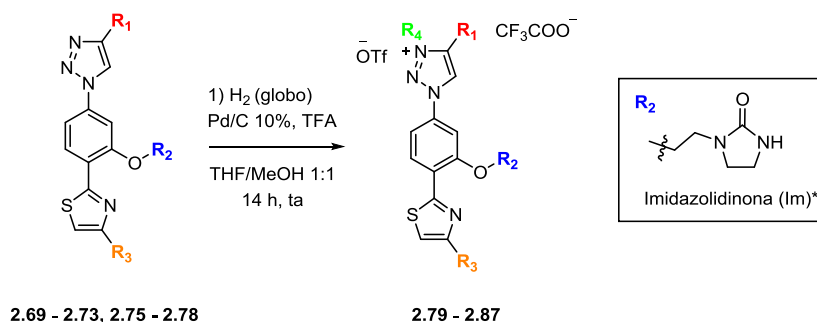
Comp	Producto de partida	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rdto alquilación (%) ^a
2.69	2.23	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	85
2.70	2.24	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Im*	-(CH=CH)-Naftil	-Me	82
2.71	2.25	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Im*	-(CH=CH)-Bifenil	-Me	70
2.72	2.25	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Im*	-(CH=CH)-Bifenil	-Et	45
2.73	2.66	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Im*	-(CH=CH)-Dihidrobenzofuranil	-Me	85
2.74	2.45	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	70
2.75	2.46	-(CH ₂) ₃ -NHCBz	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	78
2.76	2.47	-(CH ₂) ₃ -NHCBz	-Im*	-(CH=CH)-Bifenil	-Me	85
2.77	2.51	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Me	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	76
2.78	2.52	-(CH ₂) ₄ -NHCBz	-Me	-(CH=CH)-Bifenil	-Me	78

^a Rendimiento de producto aislado tras purificación cromatográfica en fase normal.

Por último, el tratamiento de las sales Cbz-protégidas con H₂, Pd/C en condiciones idénticas a las empleadas hasta el momento, condujo a los compuestos finales desprotegidos **2.79 - 2.87** de la **Serie II** en los rendimientos que se indican en la Tabla 2.3 tras purificación en fase inversa en el Biotage™ o por HPLC semipreparativo.

Cabe puntualizar que estos derivados finales se obtienen como sales mixtas de triflato (CF₃SO₃⁻) y trifluoroacetato (CF₃COO⁻) a pesar del exceso de TFA empleado en la hidrogenación, puesto que el anión triflato presente tras la alquilación del triazol, al provenir de un superácido, no se puede desplazar por tratamiento con un ácido más débil como el TFA.

Tabla 2.3. Síntesis de los compuestos finales desprotegidos de la **Serie II (2.79 - 2.87)** a partir de intermedios de la **Serie I** mediante reacción con H₂ en presencia de Pd/C al 10% y TFA.



Comp	Producto de partida	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rdto hidrogenación (%) ^a
2.79	2.69	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	36
2.80	2.70	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Naftil	-Me	50
2.81	2.71	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	-Me	31
2.82	2.72	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	-Et	27
2.83	2.73	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	-Me	45
2.84	2.75	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	49
2.85	2.76	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	-Me	25
2.86	2.77	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	19
2.87	2.78	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	-Me	29

^a Rendimiento de producto aislado tras purificación cromatográfica en fase inversa.

2.3. Evaluación biológica

2.3.1. Ensayos enzimáticos frente a *Li*-TryR

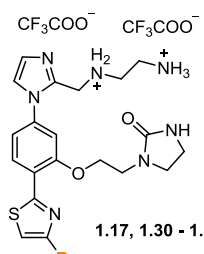
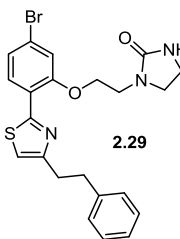
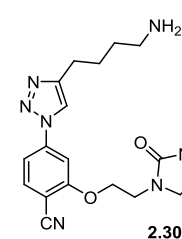
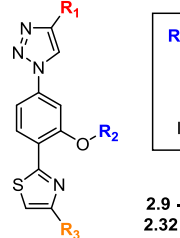
La evaluación biológica de las dos series de compuestos del **Capítulo 2** se llevó a cabo en primer lugar mediante ensayos de inhibición de la actividad enzimática y del proceso de dimerización de *Li*-TryR, idénticos a los descritos en el **Capítulo 1**.

- **Evaluación de la Serie I**

Los resultados de inhibición enzimática de la **Serie I** de triazol-fenil-tiazoles se recogen en la **Tabla 2.4**, donde se comparan los resultados obtenidos con los del prototipo peptídico **P1** y con los imidazoles **1.17**, **1.30** - **1.34** predecesores, con el fin de comparar la influencia del nuevo *scaffold* en la actividad.

En cuanto a los datos de inhibición de la actividad oxidoreductasa del primer conjunto de triazoles (**2.9** - **2.11**, **2.26** - **2.28**), con sustituyentes **R₃** idénticos o muy similares a los de los imidazoles (**1.17**, **1.30** - **1.34**), cabe señalar que se obtuvieron valores de Cl_{50} act muy similares entre ambas series. Nuevamente, los valores más potentes de inhibición se obtuvieron para los derivados con sustituyentes poliaromáticos de naftilo o bifenilo de mayor volumen (**2.27** y **2.28**), al igual que en la serie de imidazoles anteriores (**1.33** y **1.34**). Sin embargo, los resultados obtenidos en el ensayo de dimerización evidenciaron diferencias muy importantes entre los dos tipos de esqueletos heterocíclicos. Así, si bien la presencia de grupos alifáticos como -OⁱPr (**2.9**) o -^tBu (**2.10**) no dio lugar a compuestos activos en el ensayo de dimerización, la introducción de un anillo aromático sencillo como fenilo (**2.11**, **2.26** y **2.53**), unido al anillo de triazol a través de espaciadores de distinta longitud ($n = 1 - 3$, respectivamente), sí condujo a una mejora muy significativa de la capacidad desdimerizadora de las moléculas, pudiéndose medir en todos los casos una Cl_{50} dim fiable y observándose como los espaciadores de dos y tres metilenos (**2.26** y **2.53**), proporcionaron los mejores resultados en ambos ensayos enzimáticos. No obstante, la dificultad sintética de obtener el precursor α -halocarbonílico de tres metilenos, nos llevó a considerar el espaciador de dos metilenos como la cadena óptima en **R₃** para el estudio de SAR. Al igual que en el ensayo de actividad, los compuestos portadores de grupos naftilo (**2.27**) y bifenilo (**2.28**) resultaron los inhibidores más potentes en el ensayo de dimerización, con valores de Cl_{50} dim en el rango micromolar bajo, incluso inferiores a los del péptido prototipo **P1** y un orden de magnitud inferior a los del análogo de feniletilo **2.26**. En comparación con los imidazoles **1.33** y **1.34**, el porcentaje de desdimerización medido a una concentración de compuesto de 20 μ M fue muy superior en el caso de los derivados **2.27** y **2.28**, demostrando nuevamente la mejora que supone el nuevo esqueleto de triazol para la capacidad desdimerizadora de *Li*-TryR por parte de los compuestos (**Tabla 2.4**).

Tabla 2.4. Datos biológicos de la **Serie I**, de los imidazoles **1.17**, **1.30** - **1.34** y del péptido prototipo **P1**. Se recogen los valores de $Cl_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ act (μM) ^a	Cl ₅₀ dim (μM) ^a	Fórmula
P1	/	/	/	1.5 \pm 0.2	7.0 \pm 0.6	
1.17	/	/	ⁱ Pr	51.2 \pm 4.6	0% (20 μM)*	 <p>1.17, 1.30 - 1.34</p>
1.30	/	/	^t Bu	51.3 \pm 6.1	0% (20 μM)*	
1.31	/	/	-(CH ₂) ₂ -Ph	32.8 \pm 2.3	0% (20 μM)*	
1.32	/	/	-(CH ₂) ₂ -Ph	22.4 \pm 2.2	0% (20 μM)*	
1.33	/	/	-(CH ₂) ₂ -Naftil	5.1 \pm 0.4	26% (20 μM)*	
1.34	/	/	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	8.6 \pm 1.4	32% (20 μM)*	
2.9	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-O ⁱ Pr	54.5 \pm 4.4	>200	 <p>2.29</p>
2.10	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	^t Bu	24.1 \pm 1.4	>200	
2.11	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	48.6 \pm 5.4	61.2 \pm 2.8	
2.26	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	14.6 \pm 1.0	38.1 \pm 1.2	
2.53	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₃ -Ph	19.0 \pm 3.4	19.1 \pm 1.1	
2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Naftil	5.9 \pm 1.1	5.1 \pm 1.3 (75%)*	
2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	10.9 \pm 1.8	4.8 \pm 0.6 (82%)*	 <p>2.30</p>
2.29	/	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	>200	>200	
2.30	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	/	61.9 \pm 0.9	>200	
2.32	-(CH ₂) ₄ -OH	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	>200	>200	
2.33	-(CH ₂) ₄ -H	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	>200	>200	
2.34	-(CH ₂) ₄ -H	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	>200	>200	
2.35	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	41.2 \pm 8.5	94.3 \pm 2.5	 <p>2.9 - 2.11, 2.26 - 2.28 2.32 - 2.38, 2.54 - 2.56</p>
2.36	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	32.3 \pm 9.4	14.1 \pm 1.3	
2.37	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Ph	30.5 \pm 1.8	101.4 \pm 1.8	
2.38	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	21.8 \pm 5.5	11.1 \pm 0.4	
2.54	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	9.8 \pm 1.4	10.4 \pm 0.5	
2.55	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Tetrahydroquinolinil	5.3 \pm 3.7	>200	
2.56	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Dibenzofuranil	6.6 \pm 1.9	8.8 \pm 0.2	

^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la actividad enzimática o la formación del dímero. *Porcentaje de desdimerización medido a 20 μM .

Tras la comparación entre los esqueletos de imidazol y triazol (**Serie I**), se llevó a cabo el estudio de SAR en esta última serie analizando los compuestos diferentemente sustituidos en **R₁**, **R₂** y **R₃** y los compuestos truncados de esqueleto (**Tabla 2.4**).

En cuanto a **R₁** se pudo observar que la sustitución del grupo amino terminal cargado positivamente por un grupo -OH (**2.32**), o su eliminación (**2.33** y **2.34**), condujo a la pérdida total de actividad tanto en el ensayo de actividad como en el de dimerización, lo que puso en evidencia la absoluta necesidad de este grupo amino para las propiedades inhibitorias frente a *Li-TryR* de estas moléculas. Asimismo, el acortamiento del espaciador polimetilénico de 4 a 3 eslabones en **R₁** (**2.35** y **2.36**), dio lugar a una reducción de la actividad de aproximadamente 3 veces en ambos ensayos en comparación con los homólogos más activos de butilamina (**2.26** y **2.28**).

Por otro lado, la sustitución del grupo imidazolidinona en **R₂** por un grupo -Me (**2.37** y **2.38**), también condujo a la obtención de inhibidores aproximadamente 3 veces menos activos, denotando el papel importante, aunque no crucial, de este grupo funcional para la interacción de los compuestos con la enzima.

La importancia de los sustituyentes **R₁** y **R₃** se corroboró una vez más con la evaluación de los correspondientes derivados truncados en el triazol (**2.29**) y en el tiazol (**2.30**), para los que la pérdida de estos heterociclos y de sus correspondientes cadenas laterales se tradujo en una significativa reducción o incluso en la pérdida completa de actividad en ambos ensayos.

En cuanto a la presencia de heterociclos fusionados en posición **R₃**, (**2.54** - **2.56**), diseñados para equilibrar el balance lipofilia/solubilidad acuosa, se pudo observar en primer lugar que el derivado **2.54** portador de un heterociclo oxigenado de dihidrobenzofurano, resultó dos veces menos activo que el derivado de naftilo **2.27** en ambos ensayos. Por otro lado, los intentos de aumentar la potencia inhibitoria con la introducción de un heterociclo de dibenzofuranilo más voluminoso (**2.56**), no dio lugar a mejores valores de CI_{50} obteniéndose resultados similares a los de los inhibidores más potentes **2.27** y **2.28** (**Tabla 2.4**). Finalmente, la presencia de un anillo de tetrahidroquinolina en **R₃** (**2.55**) condujo a un inhibidor potente de la actividad oxidorreductasa de la enzima, que sin embargo no mostró capacidad desdimerizadora. Esta falta de actividad en el ensayo de dimerización del compuesto **2.55**, a pesar de poseer sustituyentes en las 3 posiciones del esqueleto similares a los disruptores de dimerización, también la observamos a continuación en las sales de triazolio de la **Serie II** en comparación con sus análogos de la **Serie I** y está probablemente relacionada con la presencia de una carga positiva adicional de estos compuestos.

Se pudo concluir por tanto en este apartado que los mejores derivados, desde el punto de vista de la inhibición enzimática, fueron los inhibidores **2.27** y **2.28** sustituidos con un grupo butilamina en **R₁**, un grupo imidazolidinona en **R₂**, y grupos aromáticos de naftilo y bifenilo unidos al tiazol a través de un espaciador de dos metilenos en la posición **R₃**. Estos compuestos mostraron una capacidad desdimerizadora muy superior a la de sus análogos de imidazol **1.33** y **1.34** y similar o incluso ligeramente superior a la del péptido de referencia **P1**.

- **Evaluación de la Serie II**

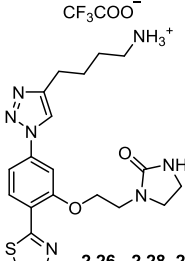
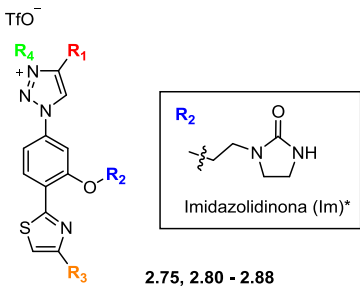
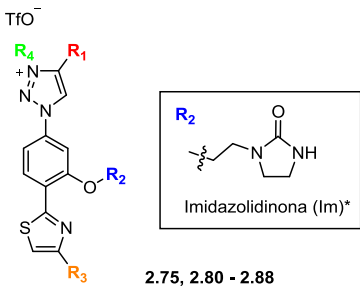
Los resultados de la evaluación biológica de los compuestos de la **Serie II** en ensayos enzimáticos se recogen en la **Tabla 2.5**, donde se muestran como compuestos de referencia el péptido **P1** y los compuestos de la **Serie I** más activos y representativos.

Las sales de triazolio diferentemente sustituidas en **R₁**, **R₂**, **R₃** y **R₄** (**2.79** - **2.87**) mostraron valores de Cl_{50} en el rango micromolar bajo, por lo general similares o incluso de dos a tres veces inferiores a sus análogos de la **Serie I** en el ensayo de actividad oxidorreductasa. No obstante dentro de estas generalidades, cabe resaltar al derivado **2.80** portador de un grupo naftilo en **R₃** que resultó ser el inhibidor más potente de las dos series de compuestos con una Cl_{50} act de 2.5 μ M, similar a la del péptido prototipo **P1**.

Sin embargo, el comportamiento de estos compuestos en el ensayo de dimerización fue dispar y en general muy diferente al de los triazoles de la **Serie I**, pudiendo apreciarse en muchos de ellos la pérdida parcial (**2.80**, **2.83** y **2.85**) o total (**2.79**, **2.82**, **2.84**, **2.86** y **2.87**) de la capacidad disruptora de la dimerización.

Analizando más en detalle las variaciones dentro de la propia serie, cabe destacar por un lado el compuesto **2.81** ya que fue la única sal de triazolio capaz de conjugar una inhibición potente tanto de la actividad (Cl_{50} act = 5.2 μ M) como de la dimerización (Cl_{50} dim = 9.5 μ M), a diferencia de todos los demás derivados de la serie. Por otro lado, mencionar que la ligera variación en la naturaleza del sustituyente **R₄** de metilo (**2.81**) a etilo (**2.83**), si bien no tuvo influencia en la inhibición de la actividad, sí que trajo consigo una pérdida significativa de la capacidad desdimerizadora. Por último en cuanto a la SAR de los sustituyentes **R₁** y **R₂** de la **Serie II**, cabe resaltar que la presencia de la carga positiva adicional del anillo de triazol parece compensar en parte la pérdida total (**2.74** vs **2.34**) o disminución parcial (**2.86** y **2.87** vs **2.37** y **2.38**) de la inhibición de la actividad oxidorreductasa experimentada tras eliminación del grupo amino o de la imidazolidinona que se había observado en la **Serie I**.

Tabla 2.5. Evaluación biológica de los compuestos de la **Serie II** tomando como referencia el péptido prototipo **P1**, y los compuestos más representativos de la **Serie I** (**2.26** - **2.28**, **2.54**). Se recogen los valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Cl ₅₀ act (μM) ^a	Cl ₅₀ dim (μM) ^a	Fórmula
P1	/	/	/	/	/	1.5 ± 0.2	7.0 ± 0.6	 2.26 - 2.28, 2.54
2.26	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	14.6 ± 1.0	38.1 ± 1.2	
2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	/	5.9 ± 1.1	5.1 ± 1.3	
2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	/	10.9 ± 1.8	4.8 ± 0.6	
2.54	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	/	/	9.8 ± 1.4	10.4 ± 0.5	
2.79	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	Me	/	12.9 ± 1.0	>200	 2.75, 2.80 - 2.88
2.80	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Naftil	Me	/	2.5 ± 0.1	82.7 ± 2.5	
2.81	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	/	5.2 ± 0.8	9.5 ± 0.8	
2.82	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	Me	/	5.4 ± 0.2	>200	
2.83	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Et	/	3.9 ± 0.6	87.1 ± 0.1	
2.74	-(CH ₂) ₃ -CH ₃	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	Me	/	51.6 ± 2.0	>200	 2.75, 2.80 - 2.88
2.84	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Ph	Me	/	17.3 ± 2.4	>200	
2.85	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Imidazolidinona	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	/	7.00 ± 0.6	45.4 ± 2.2	
2.86	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Ph	Me	/	5.5 ± 0.7	>200	
2.87	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	/	18.2 ± 2.3	>200	

^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la actividad enzimática o la formación del dímero. * Porcentaje de desdimerización medido a 20 μ M.

Se puede concluir por tanto que los derivados de la **Serie II**, en líneas generales, se comportan como inhibidores más potentes de la actividad oxidoreductasa que sus análogos de la **Serie I**, en el rango micromolar bajo. No obstante, la introducción de una carga positiva adicional en el triazol parece provocar una pérdida total o parcial de la capacidad desdimerizadora de estos compuestos, siendo el derivado **2.81** (CI_{50} act = 5.19 μ M, CI_{50} dim = 9.46 μ M) portador de un grupo bifenilo en **R₃**, el único capaz de conjugar buenos valores de CI_{50} en ambos ensayos. Del estudio conjunto de las SAR de las **Series I y II** de compuestos, se puede concluir la importancia del grupo amonio en **R₁** así como la presencia de un grupo hidrófobo poliaromático como sustituyente **R₃**, siendo más variable la influencia del grupo imidazolidinona en **R₂** en la actividad enzimática.

2.3.2. Ensayos enzimáticos frente a glutatión reductasa humana (hGR)

Tal y como comentamos en la introducción de esta memoria, la tripanotión reductasa (TryR) no sólo es un eslabón esencial para la supervivencia del parásito, sino que además supone un elemento de selectividad en la búsqueda de nuevos fármacos frente a la leishmaniasis, puesto que no se encuentra presente en los hospedadores mamíferos. En estos últimos, la labor de protección celular frente al estrés oxidativo depende fundamentalmente del sistema de glutatión (2GSH/GSSG), regulado en su etapa de regeneración por la enzima glutatión reductasa humana (hGR).

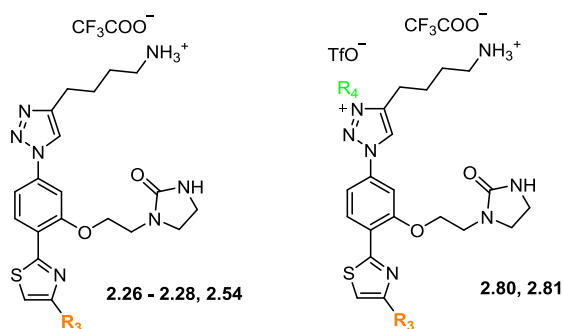
A pesar de que las diferencias estructurales de los centros activos de TryR y GR, en términos de carga y tamaño, son grandes las diferencias en la secuencia de sus dominios de dimerización son menores y por tanto nos planteamos evaluar, a continuación, la selectividad frente a la enzima homóloga humana de los compuestos de triazol y sales de triazolio más representativos.

Los resultados de la evaluación de los compuestos en ensayos de actividad y dimerización de hGR se reflejan en la **Tabla 2.6**, donde se incluyen también los resultados de inhibición de la dimerización frente a *Li*-TryR con fines comparativos y los índices de selectividad *Li*-TryR vs hGR observados.

Cabe destacar, en primer lugar, que todos ellos resultaron inactivos a la hora de inhibir la actividad oxidoreductasa de la hGR, con CI_{50} act superiores a 200 μ M en todos los casos, lo que podría explicarse debido a la carga positiva de los compuestos y su repulsión por el centro activo cargado positivamente de hGR. No obstante, en el ensayo de dimerización sí que se observó un cierto carácter desdimerizador frente a hGR para los inhibidores de *Li*-TryR más potentes **2.27**, **2.28**, **2.54** y **2.81**, aunque de 2 a 5 veces menor que el observado en la enzima del parásito. Por último en cuanto a las SAR de cada una de las series, se pudo apreciar la misma tendencia que la observada en *Li*-TryR donde grupos poliaromáticos voluminosos en **R₃** son los que proporcionaron mejores valores de inhibición, siendo la sal **2.81** nuevamente la

única que presentó actividad en el ensayo de dimerización frente a hGR aunque 3.5 veces menor que frente a la homóloga del parásito.

Tabla 2.6. Se recogen los valores de $Cl_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM) del ensayo de inhibición del proceso de dimerización de hGR y *Li*-TryR por parte de los compuestos **2.26** - **2.28**, **2.54**, **2.80** y **2.81**.



Compuesto	R_3	R_4	Cl_{50} actividad hGR (μM) ^a	Cl_{50} dimerización hGR (μM) ^a	Cl_{50} dimerización <i>Li</i> -TryR (μM) ^a	IS ^b
2.26	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	>200	>200	38.1 \pm 1.2	>5.2
2.27	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	>200	25.6 \pm 3.4	5.1 \pm 1.3	5
2.28	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	>200	16.9 \pm 0.4	4.8 \pm 0.6	3.6
2.54	-(CH ₂) ₂ - Dihidrobenzofuranil	/	>200	23.7 \pm 0.8	10.4 \pm 0.5	2.3
2.80	-(CH ₂) ₂ -Naftil	Me	>200	>200	82.7 \pm 2.5	>2.4
2.81	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	>200	33.3 \pm 0.6	9.5 \pm 0.8	3.5

^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la formación del dímero o la actividad de la enzima. ^b Índice de selectividad entre los valores de Cl_{50} de hGR y *Li*-TryR.

Estos estudios ponen de manifiesto la mayor selectividad de los compuestos por *Li*-TryR respecto a hGR en cuanto a su capacidad de alterar el estado dimérico de ambas enzimas, lo cual supone un resultado prometedor y relevante teniendo en cuenta la mayor dificultad que representa *a priori* la búsqueda de selectividad en compuestos disruptores de la dimerización respecto a los análogos de sustrato a nivel de centro activo.

2.3.3. Estudio de la eficiencia del ligando y análisis de las propiedades *druglike*

El objetivo de este trabajo ha sido obtener no sólo disruptores potentes e innovadores de la dimerización de *Li*-TryR, sino también compuestos que conjuguen sus propiedades inhibitorias con buenas propiedades fisicoquímicas que puedan dar lugar a buenas propiedades como fármaco (*druglike*).

Dentro de este objetivo y en analogía con las estrategias comúnmente empleadas en el campo de la Química Médica, resulta habitual que durante las primeras fases de selección y optimización de compuestos cabezas de serie (*hits*), se produzca un incremento del peso

molecular y de la lipofilia paralelamente a la búsqueda de una mayor afinidad de los ligandos.³⁶ Además, como se ha comentado también en la introducción de este trabajo, esta tendencia de aumentar el tamaño molecular en busca de mayor actividad es más notable si cabe en el diseño de inhibidores de interacciones proteína-proteína, debido al tamaño de la superficie a lo largo de la cual se producen estas interacciones.³⁷ Por tanto, de estas observaciones se desprende que la monitorización y control de parámetros *druglike* como el peso molecular, la lipofilia o la solubilidad, entre otros, resulta crucial para la obtención de compuestos optimizados con menores probabilidades de fallar en etapas posteriores del desarrollo de fármacos por problemas de toxicidad, permeabilidad o promiscuidad.³⁸

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en los siguientes apartados de este trabajo decidimos llevar a cabo el análisis de las propiedades *druglike* de algunos de los compuestos más representativos de esta Tesis Doctoral, y su conexión con la actividad biológica. Para ello en primer lugar, exploramos la influencia del peso molecular y de la lipofilia de los compuestos sobre la actividad enzimática, a través de los parámetros de eficiencia del ligando (*Ligand Efficiency*, LE) y eficiencia lipofílica del ligando (*Lipophilicity Ligand Efficiency*, LLE), conocidos genéricamente como métricas de eficiencia del ligando.³⁸ En segundo lugar, llevamos a cabo un estudio experimental de la solubilidad en agua así como la evaluación de las distintas propiedades como fármaco de los compuestos más representativos sintetizados en este trabajo, con el fin último de elegir los mejores candidatos para etapas más avanzadas del proyecto.

- **Eficiencia del ligando (*Ligand Efficiency*, LE)**

La eficiencia del ligando (LE) se define como la energía de unión media por átomo distinto de hidrógeno (*Heavy Atom*, HA) (**Ecuación 2.1**), o lo que es lo mismo, es una medida de la forma en la que una molécula emplea sus características estructurales para interactuar con la diana.

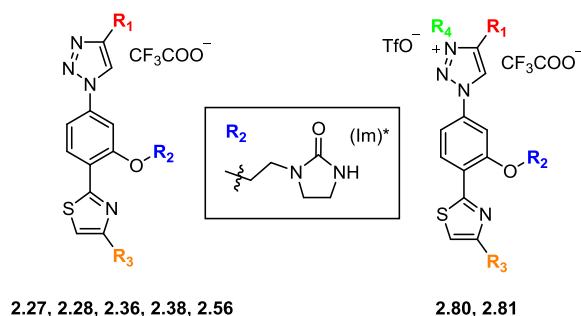
$$LE = (1.37/HA) \times pIC_{50}$$

Ecuación 2.1. Eficiencia del ligando (LE).

De acuerdo con la bibliografía,³⁹ se propone como un valor adecuado de LE aquellos superiores a 0.29 kcal/mol/HA, cuyo dato proviene originalmente del análisis de una quimioteca de la farmacéutica Pfizer donde sus candidatos más potentes y prometedores poseen un valor medio de Cl_{50} de 10 nM y están constituidos por 38 átomos “pesados”.

Aplicando la **Ecuación 2.1** a los valores de Cl_{50} dim obtenidos con los disruptores de dimerización más potentes y representativos de las **Series I y II** de este capítulo, se obtuvieron los valores de LE dim que se muestran en la **Tabla 2.7**.

Tabla 2.7. Valores de eficiencia del ligando en el ensayo de dimerización (LE dim) de los inhibidores más potentes y representativos de este capítulo.



Comp	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	HA ^a	Cl ₅₀ dim (μM) ^b	LE dim ^c
2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	42	5.1 ± 1.3	0.17
2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	44	4.8 ± 0.6	0.16
2.56	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ - Dibenzofuranilo	/	45	8.8 ± 0.2	0.15
2.36	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	43	14.1 ± 1.3	0.16
2.38	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	37	11.1 ± 0.4	0.18
2.80	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Naftil	Me	43	82.7 ± 2.5	0.13
2.81	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	45	9.5 ± 0.8	0.15

^a Átomos distintos de hidrógeno, *heavy atoms*; ^b Concentración necesaria por inhibir al 50% la dimerización de la enzima; ^c Eficiencia del ligando en el ensayo de dimerización.

En primer lugar, puede observarse como todos nuestros compuestos presentan valores de LE dim inferiores a los propuestos en la bibliografía como referencia, lo cual no es de extrañar debido al rango de actividad de nuestras moléculas a nivel micromolar en comparación con el rango nanomolar habitualmente presente para las dianas descritas. No obstante, al comparar los valores de LE dim de la **Serie I** destaca el derivado modificado en **R₂** **2.38** para el que la eliminación de los 7 átomos distintos de hidrógeno de la imidazolidinona de esa posición, no supone una pérdida significativa de potencia inhibitoria en el ensayo enzimático, mostrando el valor más alto de su serie. En cambio, el derivado tricíclico de dibenzofurano **2.56** presenta el valor más bajo de LE puesto que el incremento del número de átomos del sustituyente en **R₃**, no se tradujo en una mejora significativa de su capacidad desdimerizadora.

Por otro lado, las sales de triazolío **2.80** y **2.81** presentan valores inferiores a sus análogos **2.27** y **2.28** de la **Serie I**, puesto que la suma de 1 átomo pesado a través del metilo en N3 del triazol, no sólo no conlleva una mejora de la capacidad desdimerizadora sino que en el caso de **2.27** supone incluso una pérdida notable de la misma.

- **Eficiencia lipofílica del ligando (*Lipophilicity Ligand Efficiency*, LLE o LipE)**

La lipofilia es una propiedad muy utilizada en la optimización de la afinidad o potencia de los ligandos por la diana, que influye también y de manera determinante en el progreso de moléculas a lo largo de programas de búsqueda de nuevos fármacos. Así, una elevada lipofilia puede estar asociado a problemas de toxicidad y tiene una enorme influencia en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) de los compuestos.³⁸ Por tanto, con el fin de evitar un incremento improductivo de la lipofilia, otra de las métricas de eficiencia del ligando comúnmente monitorizada y optimizada durante el desarrollo de fármacos es la eficiencia lipofílica del ligando (LLE), cuyo criterio es muy empleado por la industria farmacéutica en las etapas del “hit to lead” del desarrollo de nuevos fármacos.⁴⁰ Este parámetro se define como la cantidad de potencia inhibitoria por unidad de lipofilia (expresada a través del logP o logD), o dicho de otro modo, la eficiencia de la lipofilia para contribuir a la energía de unión final del ligando (**Ecuación 2.2**).

$$\text{LLE} = \text{LipE} = \text{pCl}_{50} \text{ (o pK}_i\text{)} - \text{cLogP (o cLogD)}$$

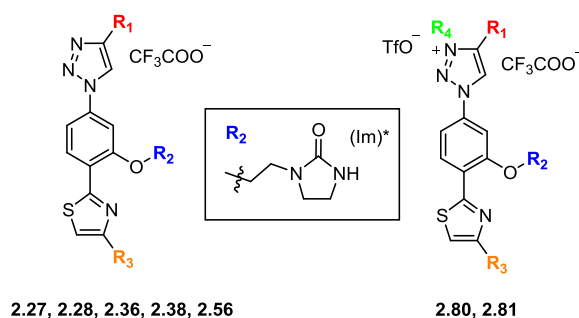
Ecuación 2.2. Eficiencia lipofílica del ligando (LLE).

Analizando las propiedades farmacocinéticas de los medicamentos de administración oral actuales, se estima que los valores óptimos de LLE son aquellos que superan el valor de 5, tomando como referencia nuevamente una Cl_{50} de 10 nM y valores de cLogP de 2 - 3 comúnmente aceptados como óptimos para una buena disponibilidad oral.⁴⁰

La medición de este parámetro en nuestros inhibidores de *Li-TryR*, resulta especialmente interesante puesto que como se ha puesto de manifiesto en la evaluación enzimática de los compuestos de este **Capítulo 2**, la presencia de grupos hidrófobos poliaromáticos en posición **R₃** del esqueleto resulta crucial a la hora obtener inhibidores potentes tanto de la actividad oxidorreductasa como del proceso de dimerización

Teniendo en cuenta estas consideraciones, llevamos a cabo la estimación de la LLE de los compuestos de las **Series I y II** teniendo en cuenta las Cl_{50} de los ensayos de actividad (LLE act) y dimerización (LLE dim), así como los valores de cLogP calculados mediante el programa informático para el descubrimiento de fármacos OSIRIS Data Warrior.⁴¹ En la **Tabla 2.9** se recogen a modo de ejemplo los valores de LLE act y LLE dim calculados según la ecuación anterior para los inhibidores más potentes y representativos de ambas series.

Tabla 2.9. Valores de eficiencia lipofílica del ligando en el ensayo de actividad (LLE act) y en el ensayo de dimerización (LLE dim), obtenidos a partir de los valores de Cl_{50} act/ Cl_{50} dim y clogP de los inhibidores más potentes y representativos de este capítulo.



Comp	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Cl ₅₀ dim (μM) ^a	clogP	LLE dim ^c
2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	5.1 ± 1.3	1.27	3.88
2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	4.8 ± 0.6	1.74	3.49
2.56	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Dibenzofuranilo	/	6.6 ± 1.9	1.85	3.21
2.36	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	14.1 ± 1.3	1.29	3.68
2.38	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	11.1 ± 0.4	2.20	2.59
2.80	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Naftil	Me	82.7 ± 2.5	-0.75	4.84
2.81	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im*	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	9.5 ± 0.8	-0.29	5.28

^a Concentración necesaria por inhibir al 50% la actividad oxidorreductasa o la dimerización; ^b Lipofilia calculada; ^c Eficiencia lipofílica del ligando.

Para los inhibidores **2.27**, **2.28**, **2.36** y **2.56** de la **Serie I**, se aprecia como la introducción del tercer anillo aromático en **R₃** (**2.56**) no supone una mejora de la LLE dim con respecto a los grupos naftilo (**2.27**) o bifenilo (**2.28**) puesto que la capacidad desdimerizadora no aumenta a pesar del incremento de clogP. Además, el compuesto modificado en **R₂** **2.38** presentó los valores de LLE dim más bajos por lo que no se presenta como un ligando enzimáticamente eficiente en términos de lipofilia. Los derivados **2.80** y **2.81** de la **Serie II**, mostraron valores de LLE superiores a los de los compuestos de la **Serie I** asociados a valores negativos de clogP.

A continuación, con el fin de evaluar el potencial de estos inhibidores como agentes leishmanicidas en modelos más avanzados, decidimos llevar a cabo el análisis de algunas de las propiedades como fármaco más importantes.

• Análisis las propiedades como fármaco (propiedades druglike)

Desde un punto de vista clásico del diseño de fármacos, “la regla del 5” de Lipinski propuesta en 1997 por Christopher A. Lipinski⁴² y basada en observaciones experimentales, fue una regla empírica a seguir de cara a predecir posibles problemas de absorción o permeabilidad por difusión pasiva de los fármacos para una biodisponibilidad oral. Los

compuestos no deberían incumplir más de uno de los siguientes supuestos: no más de 5 donadores de hidrógeno o más de 10 aceptores de hidrogeno, un peso molecular superior a 500 o un logP (coeficiente de partición octanol/agua) mayor de 5. El análisis posterior llevado a cabo en 2002 por Daniel F. Veber y colaboradores⁴³ de una librería de 1100 candidatos a fármaco de GlaxoSmithKline (GSK), permitió ampliar estos primeros criterios con otros descriptores como por ejemplo la flexibilidad molecular (número de enlaces rotables, ER) o la superficie polar total accesible al disolvente (*Topological Polar Surface Area*, TPSA). De acuerdo con estos últimos criterios, una buena biodisponibilidad oral se daría en aquellas moléculas bioactivas que no presentan un número de enlaces rotables superior a 10, o una TPSA superior a 150 Å². Los criterios *druglike* más recientes incluyen parámetros como el número de anillo aromáticos (nAR)⁴⁴ o la fracción de átomos de carbono sp³ (Fsp³).⁴⁵ Para estos dos últimos indicadores se toma como referencia los valores de número de anillos de 1 a 4 y 0.36 - 0.47 para Fsp³ respectivamente de acuerdo con el análisis de la estructura de los fármacos actualmente disponible.

No obstante, es necesario resaltar que los valores considerados como óptimos hoy en día, por corresponder a los que presentan un alto porcentaje de fármacos comerciales de administración por vía oral, están en constante evolución a medida que se avanza en el conocimiento de nuevas dianas y tratamientos. Un buen ejemplo de este cambio lo representan criterios como el peso molecular para el que la media de los fármacos orales aprobados por la FDA desde 1998 hasta 2017, presentan un valor de 571 actualmente, a diferencia del valor medio de 470 estipulado en 1997, observándose además un aumento del número de enlaces rotables (de 10 a 11).⁴⁶

La implementación sistemática de estas premisas en los primeros estadios del diseño de fármacos ha permitido, en los últimos años, disminuir la tasa de abandono de candidatos clínicos por problemas relacionados con la biodisponibilidad oral y la toxicidad.⁴⁷ No obstante, es necesario tener en cuenta que la aplicación exhaustiva de estos criterios en el desarrollo de nuevas moléculas bioactivas no asegura el éxito, ya que existen múltiples ejemplos de estructuras farmacológicas aprobadas cuyas propiedades fisicoquímicas se encuentran fuera del espacio definido por reglas empíricas como los criterios de Lipinski y posteriores.⁴⁷ La sobreenfatización en las premisas clásicas de biodisponibilidad, habría dejado fuera fármacos basados en productos naturales tan importantes como la Penicilina G, la Anfotericina B o el Paclitaxel (taxol).⁴⁸

Los inhibidores de interacciones proteína-proteína suelen ser por su parte otro ejemplo de compuestos para los que valores como el peso molecular o el logP, acaban situándose fuera de los límites clásicamente establecidos durante la búsqueda de afinidad por la amplia e inespecífica superficie de las dianas. Quizás uno de los mejores ejemplos de este tipo de

excepciones lo representa el fármaco Navitoclax™, un inhibidor de la interacción BH3/Bcl-2, actualmente en fase II como anticanceroso de administración oral.⁴⁹

Finalmente cabe destacar que junto con los anteriores descriptores *druglike* mencionados, la solubilidad acuosa es una de las propiedades experimentales más importantes a la hora de conseguir un candidato farmacológico con buena biodisponibilidad oral. Dado que este parámetro es inversamente proporcional a la lipofilia, y esta última ha sido uno de los factores principales a la hora de conseguir aumentar la potencia de nuestros inhibidores, un buen equilibrio entre lipofilia y solubilidad en agua ha sido una consideración que ha estado muy presente a lo largo de esta Tesis Doctoral.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones y sus limitaciones, en este apartado del trabajo se pretende evaluar algunas propiedades como fármaco para una buena biodisponibilidad oral de los compuestos más representativos de los **Capítulos 1 y 2** mediante la medición de propiedades experimentales como la solubilidad acuosa, pero también a través de predicciones computacionales de otros valores como cLogP o TPSA. En la **Tabla 2.9** se recogen los valores de solubilidad acuosa termodinámica máxima (S) experimental cuantificados mediante HPLC, así como el cLogP, el peso molecular (PM), la TPSA, el número de donadores y aceptores de enlace de hidrógeno (nDH y nAH), el número de enlaces rotables (ER), la fracción de carbonos sp³ (Fsp³) y el número de anillos aromáticos (nAR) de algunos de los compuestos más representativos de este trabajo.

Comenzando por los estudios experimentales de solubilidad acuosa termodinámica máxima, para los derivados de imidazol se pudo observar como todos ellos presentaron muy buenos valores de solubilidad, comprendidos en el rango entre 25 y 170 mg/ml y dependientes de la hidrofobicidad del sustituyente **R₃**. Para los derivados **1.30** y **1.31** no se pudo estimar la solubilidad máxima debido a la falta de compuesto necesario para saturar la disolución de muestra. En el caso de los triazoles de la **Serie I** se observaron menores solubilidades que para los imidazoles anteriores, aunque con valores en general superiores al mg/ml. Dentro de esta serie, la introducción de grupos hidrófobos como naftilo (**2.27**) o bifenilo (**2.28**) se tradujo en una menor solubilidad con respecto a **2.26**. No obstante, la introducción de un heterociclo oxigenado en **R₃**, como estrategia para equilibrar el efecto hidrófobo con la solubilidad, permitió sólo una ligera mejora en la solubilidad del derivado **2.54** respecto a su prototipo de naftaleno **2.27**.

CAPÍTULO 2

Tabla 2.9. Solubilidad experimental y parámetros calculados mediante el programa OSIRIS criterios *druglike* para algunos compuestos de imidazol y triazol.

Serie	Comp	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	S _{exp} (mg/mL) ^a	cLogP ^b	PM ^c	nDH ^d	nAH ^e	TPSA ^f	ER ^g	Fsp ^{3h}	nAR ⁱ
Imidazol	1.17	/	/	- ⁱ Pr	/	170	-3.17	485.7	3	9	144.8	12	0.46	3
Imidazol	1.30	/	/	- ^t Bu	/	>25	-2.61	499.7	3	9	144.8	12	0.48	3
Imidazol	1.31	/	/	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	SD	-2.79	519.7	3	9	144.8	12	0.30	4
Imidazol	1.32	/	/	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	97	-2.41	533.7	3	9	144.8	13	0.32	4
Imidazol	1.33	/	/	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	57	-1.21	583.8	3	9	144.8	13	0.28	5
Imidazol	1.34	/	/	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	84	-0.75	609.8	3	9	144.8	14	0.26	5
Triazol (I)	2.26	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	6.4	0.08	532.7	2	9	141.1	13	0.36	4
Triazol (I)	2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	2.1	1.27	582.7	2	9	141.1	13	0.31	5
Triazol (I)	2.54	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	/	2.3	0.31	574.7	2	10	149.9	13	0.40	4
Triazol (I)	2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	0.2	1.74	608.8	2	9	141.1	14	0.29	5
Triazol (I)	2.36	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	2.8	1.29	594.8	2	9	141.1	13	0.27	5
Triazolio (II)	2.79	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	Me	>15.9	-1.95	547.7	2	9	132.0	13	0.38	4
Triazolio (II)	2.80	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Naftil	Me	23.5	-0.75	597.8	2	9	132.0	13	0.33	5
Triazolio (II)	2.81	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	12.4	-0.29	623.8	2	9	132.0	14	0.31	5
Triazolio (II)	2.84	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	Me	40.9	-2.40	533.7	2	9	132.0	12	0.36	4
Triazolio (II)	2.85	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	- Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	21.6	-0.74	609.8	2	9	132.0	13	0.29	5

^a Solubilidad acuosa termodinámica máxima medida experimentalmente mediante HPLC; ^b Lipofilia calculada; ^c Peso molecular calculado para el catión; ^d Número de dadores de enlace de hidrógeno; ^e Número de aceptores de enlace de hidrógeno; ^f Superficie polar total accesible al disolvente (Å²); ^g Número de enlaces rotables; ^h Porcentaje de Csp³ con respecto al número total de C; ⁱ número de anillos aromáticos.

En lo que respecta a las sales de triazolio de la **Serie II**, se pudo comprobar que su solubilidad es mucho mayor que la de sus homólogos de la **Serie I** como consecuencia de la carga positiva adicional del triazol, llegando a ser incluso 1 orden de magnitud superior en la mayor parte de los casos. Además, se observó que la solubilidad no sólo es fuertemente dependiente de la naturaleza del sustituyente R_3 , sino también de la longitud de la cadena en R_1 donde el derivado de butilamina **2.81** presentó una menor solubilidad que el derivado de propilamina **2.85**.

Según los criterios de solubilidad de la farmacopea de Estados Unidos (USP30/NF25), todos los compuestos pueden ser clasificados como muy solubles puesto que se requiere menos de 1 parte de disolvente (agua) para disolver una parte de soluto.

En cuanto al cLogP (**Figura 2.10**) se observó como todos los derivados de imidazol presentaron valores negativos y dependientes del tamaño e hidrofobicidad del sustituyente R_3 , siendo el derivado de bifenilo **1.34** el que presentó un valor más alto. Como cabría esperar viendo las solubilidades anteriores, los valores de logP calculados para los triazoles de la **Serie I** fueron superiores a los de los imidazoles, situándose en un intervalo entre 0.1 y 1.7 que se encuentra a su vez dentro de las referencias comúnmente aceptadas (entre -0.4 y 5.6).⁵⁰ La **Serie II** mostró valores negativos de clogP siendo los derivados de naftilo (**2.80**) y bifenilo (**2.81** y **2.85**) los que presentaron los coeficientes más altos de su serie, llegando a situarse próximos al límite inferior propuesto de -0.4.

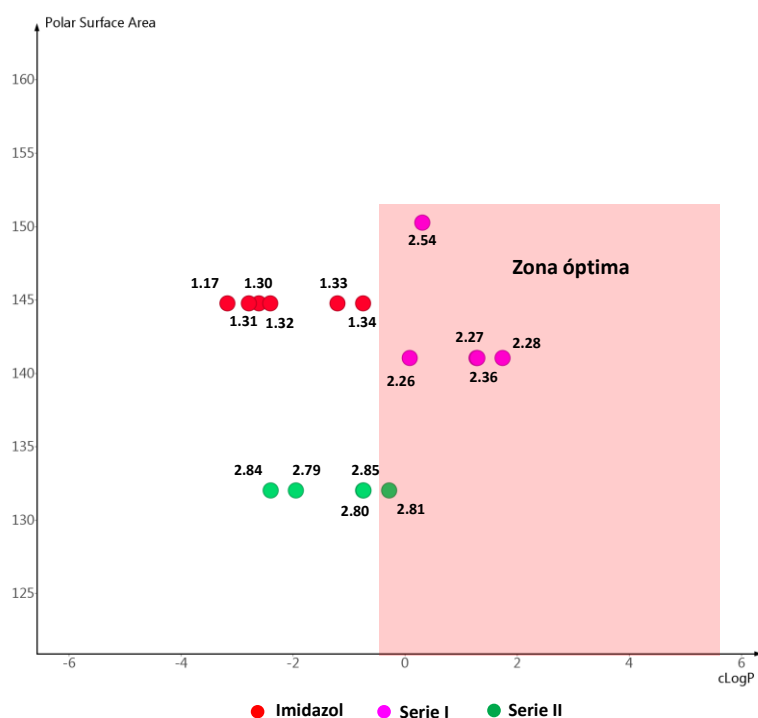


Figura 2.10. Representación de los valores de TPSA y cLogP de los compuestos más representativos de la serie del imidazol y de las series I y II del triazol.

Atendiendo al peso molecular, se puede apreciar como la introducción de sustituyentes poliaromáticos voluminosos como estrategia para lograr actividades inhibitorias elevadas especialmente en el ensayo de dimerización (**2.27**, **2.28**, **2.54** o **2.81**), hace que los compuestos presenten un peso molecular medio en torno a 598. Este hecho no es de extrañar ya que como se ha indicado en la introducción de este apartado, la desestabilización de interacciones proteína-proteína con moléculas pequeñas, suele conllevar el abandono del espacio tradicional que ocupan los fármacos actuales en favor de una mayor afinidad y selectividad.^{51,52}

El número de dadores y aceptores de enlace de hidrógeno de todos los compuestos de la **Tabla 2.2** se encuentra dentro de los valores comúnmente aceptados de 5 para los primeros y 10 para los segundos. Con respecto a los valores de TPSA, todos los compuestos analizados se encuentran por debajo de los 150 Å² propuestos como límite para una buena absorción pasiva de las moléculas (**Figura 2.10**). El número de enlaces rotables de los inhibidores de los **Capítulos 1** y **2**, supera el límite superior de 10 propuesto por Veber y colaboradores⁴³ para una buena biodisponibilidad oral, lo que sugiere una excesiva flexibilidad molecular que puede suponer el punto de partida para futuras mejoras en estas series de derivados. Finalmente, la introducción de ciclos aromáticos en **R₃** en busca de afinidad, sumado a los 3 anillos que conforman el esqueleto central, hace que el número de ciclos aromáticos totales se eleve a 4/5, y consecuentemente la Fsp³ se sitúe en torno a 0.3 - 0.4, por lo que la exploración de heterociclos saturados en la línea del dihidrobenzofurano o la tetrahydroquinolina ya estudiados en **R₃**, podría ser una estrategia interesante de cara al futuro.

Una vez estudiadas la eficiencia del ligando y de su lipofilia en la inhibición de *Li-TryR* y analizados los rasgos generales del perfil *druglike* de nuestros compuestos, el siguiente paso fue el estudio *in vitro* de la actividad leishmanicida y citotóxica de los derivados de triazol más representativos así como el estudio del mecanismo de acción en el parásito.

2.3.4. Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad

En primer lugar se llevó a cabo la evaluación de los compuestos de la **Series I** y **II** de triazol frente a parásitos extracelulares de *L. infantum*.

- **Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida frente parásitos extracelulares**

Estos estudios se llevaron a cabo en el laboratorio del Prof. Antonio Jiménez de la Universidad de Alcalá, evaluándose el efecto leishmanicida de los inhibidores frente a las morfologías promastigote y amastigote axénico del parásito y la citotoxicidad en líneas humanas de hepatocitos HepG2 de manera similar a la descrita en el **Capítulo 1**.

Los resultados se recogen en la **Tabla 2.10** donde se comparan los compuestos más representativos de las **Series I** y **II**, con los inhibidores de imidazol **1.32** - **1.34** (**Capítulo 1**), y con el fármaco Miltefosina aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis.

Tabla 2.10. Evaluación *in vitro* de los compuestos más representativos de las **Serie I** y **Serie II** frente a promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y frente a células humanas HepG2. Se recogen los valores de CE₅₀ ± DE (desviación estándar) (μM). Como compuestos de referencia se incluyen los imidazoles **1.32** - **1.34** y el fármaco Miltefosina.

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	R ₄	CE ₅₀ promastigotes (μM) ^a	CE ₅₀ amastigotes (μM) ^a	CE ₅₀ HepG2 (μM) ^a	IS ^b	Fórmula
Miltefosina	/	/	/	/	/	15.0 ± 10.8	2.8 ± 0.1	≥75	≥5/≥27	
1.32	/	/	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	≥75	≥75	≥75	/	
1.33	/	/	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	/	12.8 ± 0.8	12.8 ± 1.4	27.1 ± 2.4	2.1/2.1	
1.34	/	/	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	/	5.3 ± 0.3	5.3 ± 0.2	14.2 ± 0.9	2.7/2.7	
2.10	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	- ^t Bu	/	/	45.5 ± 3.0	18.2 ± 0.2	SD	SD	
2.11	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-CH ₂ -Ph	/	/	≥75	≥75	SD	SD	
2.26	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	30.5 ± 0.2	13.0 ± 0.6	30.1 ± 3.1	1.0/2.3	
2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	/	8.4 ± 0.4	15.3 ± 1.7	33.3 ± 2.7	4.0/2.2	
2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	/	4.9 ± 0.4	11.6 ± 0.8	60.0 ± 2.5	12.2/5.2	
2.54	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	/	/	22.5 ± 0.4	7.1 ± 0.2	29.4 ± 0.7	1.3/4.1	
2.35	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	12.7 ± 0.3	31.6 ± 5.8	25.7 ± 2.2	2.0/<1	
2.36	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	/	5.8 ± 0.7	5.2 ± 0.3	60.4 ± 3.0	10.4/11.6	
2.38	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	/	SD	3.6 ± 0.3	9.0 ± 0.6	SD/2.5	
2.79	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	Me	≥75	≥75	≥75	/	
2.80	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	Me	10.1 ± 0.5	12.9 ± 0.5	≥75	≥7.4/≥5.8	
2.81	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	Me	17.6 ± 1.8	11.1 ± 0.9	≥75	≥4.3/≥6.8	
2.83	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	/	Me	41.6 ± 0.9	≥75	≥75	≥1.8/-	
2.82	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	Et	6.0 ± 0.5	14.0 ± 1.1	≥75	≥12.5/≥5.4	
2.84	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	Me	23.0 ± 1.5	≥75	≥75	≥3.3/-	
2.85	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-Im	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	Me	4.0 ± 1.1	4.8 ± 0.3	≥75	≥19/≥15.6	
2.87	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-Me	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	Me	SD	7.6 ± 0.3	41.4 ± 4.2	SD/5.5	

^a Concentración que causa una disminución del 50% de la concentración de parásitos o de células humanas; ^b Índice de selectividad promastigote/amastigote.

En cuanto a la actividad leishmanicida, cabe señalar en primer lugar que, en general, todos los compuestos de ambas series (salvo **2.11** y **2.79**), mostraron actividad leishmanicida significativa frente a las dos formas del parásito, lo que demostró una buena permeabilidad celular de los derivados del nuevo *scaffold* de triazol y sus sales de triazolio, al igual que ocurría en la serie de imidazol predecesora.

A pesar de las dificultades para establecer SAR con datos de cultivo celular, en donde más de un diana puede estar siendo objeto de inhibición por parte de los compuestos, se pudieron observar con claridad algunas tendencias. Así, a diferencia de los ensayos enzimáticos, los derivados modificados en **R₁** (**2.36** y **2.85**) y **R₂** (**2.38** y **2.87**), no sólo no mostraron peor actividad que los derivados de referencia (**2.28** para **R₁** y **2.81** para **R₂**), sino que llegaron a alcanzar los valores de CE₅₀ frente a parásitos más bajos de ambas series del triazol, con cifras en el rango micromolar bajo frente a ambas morfologías de *L. infantum*.

Respecto a los resultados de citotoxicidad, es interesante destacar en primer lugar que en general, todos los derivados de triazol y sales de triazolio resultaron menos tóxicos que los derivados de imidazol predecesores, especialmente las sales de triazolio (**Serie II**) que fueron a su vez menos tóxicas que sus análogos de la **Serie I**, lo que se tradujo en mejores índices de selectividad superiores incluso a 15 en el caso de **2.85**. Cabe destacar que la presencia de la imidazolidinona en **R₂** fue favorable en términos de citotoxicidad, ya que los derivados **2.28** y **2.81** resultaron menos citotóxicos que los compuestos **2.38** y **2.87** con un grupo -OMe en dicha posición. Por último cabe destacar que el sustituyente bifenilo de **R₃** dio lugar a compuestos con una notable menor toxicidad (**2.28** y **2.36**), especialmente apreciable en la **Serie I**.

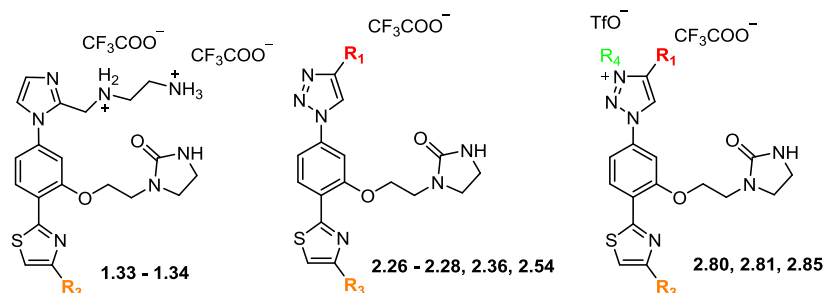
Por tanto, a la vista de estos resultados se podría concluir que los derivados de propilamina **2.36** y **2.85** y de butilamina **2.28**, **2.80** y **2.81** de ambas series resultaron ser los agentes leishmanicidas más potentes y selectivos frente a distintas formas de parásito extracelular obtenidos hasta el momento.

- **Evaluación *in vitro* de la actividad leishmanicida frente a amastigotes intracelulares**

Avanzando desde los ensayos enzimáticos iniciales hacia modelos biológicos más complejos, el siguiente paso fue la evaluación biológica de los compuestos más representativos de ambas series en modelos *in vitro* de macrófago infectado con amastigotes de *L. infantum* que expresan la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP), y que suponen un modelo clínico más relevante de este parásito intracelular.

Los compuestos seleccionados para estos ensayos fueron los triazoles **2.26** - **2.28**, y **2.54** de la **Serie I**, así como las sales de triazolio **2.80** y **2.81** de la **Serie II**, estando pendiente la evaluación de los derivados de propilamina **2.36** y **2.85**. Los resultados de dichos ensayos se recogen en **Tabla 2.9** donde se comparan los valores obtenidos para dichos compuestos con los de los compuestos de imidazol **1.33** y **1.34** del **Capítulo 1**, y con los de Miltefosina.

Tabla 2.9. Actividad leishmanicida y citotoxicidad de los compuestos más representativos de las **Series I** y **II** **2.26 - 2.28, 2.36, 2.54, 2.80, 2.81 y 2.85**, de los imidazoles **1.33** y **1.34** y de Miltefosina en monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos e infectados con amastigotes GFP de *L. infantum*.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CE ₅₀ amastigotes intracelulares (μM) ^a	CE ₅₀ HepG2 (μM) ^a	IS ^b
Miltefosina	/	/	/	8.0 ± 2.6	≥75	>9.4
1.33	/	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	21.5 ± 1.4	27.1 ± 2.4	1.3
1.34	/	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	14.5 ± 0.7	14.2 ± 0.9	1.0
2.26	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	33.6 ± 1.5	30.1 ± 3.1	<1
2.27	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	31.2 ± 9.1	33.3 ± 2.7	1.1
2.28	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	20.8 ± 1.0	60.0 ± 2.5	2.9
2.54	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Dihidrobenzofuranil	/	50.1 ± 6.7	29.4 ± 0.7	<1
2.36	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	SD ^c	60.4 ± 3.0	SD ^c
2.80	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Naftil	Me	12.4 ± 3.7	≥75	>6
2.81	-(CH ₂) ₄ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	11.9 ± 1.0	≥75	>6.3
2.85	-(CH ₂) ₃ -NH ₃ ⁺	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	Me	SD ^c	≥75	SD ^c

^a Concentración que causa una disminución del 50% de amastigotes intracelulares de *L. infantum* o de células humanas; ^b Índice de selectividad de las células HepG2 frente a los amastigotes intracelulares; ^c Sin determinar.

De acuerdo con estos resultados y en concordancia con los obtenidos en los ensayos frente a parásitos extracelulares, todos los compuestos mantuvieron una actividad leishmanicida significativa en este modelo intracelular de infección. La susceptibilidad de los amastigotes intracelulares frente a nuestro compuestos, evidenció de nuevo una excelente permeabilidad celular y eficacia de ambas series de triazol en ese sentido. En cuanto a los derivados de la **Serie I**, mostraron actividades moderadas con índices de selectividad similares a los imidazoles **1.33** y **1.34**. Cabe destacar el compuesto **2.28**, portador de un grupo bifenilo en **R₂**, que al igual que ocurría en el ensayo con amastigotes axénicos presentó los mejores índices de selectividad, casi tres veces superiores a los imidazoles de referencia.

En cambio, el compuesto **2.54**, portador de un grupo dihidrobenzofuranilo más soluble, presentó menor efecto leishmanicida y mayor citotoxicidad.

Por su parte, las sales de triazolio **2.80** y **2.81** de la **Serie II** portadoras de grupos naftilo y bifenilo respectivamente en **R₃**, exhibieron muy buenas actividades leishmanicidas (CE_{50} cercanos a 10 μ M), y sobre todo menores citotoxicidades que condujeron a $IS > 6$, superiores a sus análogos de triazol de la **Serie I**, a los imidazoles e incluso próximos a la referencia de Miltefosina ($IS > 9.4$).

De este estudio se desprende que las sales de triazolio **2.80** y **2.81**, a la espera de los resultados de los derivados de propilamina **2.36** y **2.85** en amastigotes intracelulares, representan los agentes leishmanicidas más potentes y selectivos obtenidos hasta el momento en esta Tesis Doctoral lo que les convierte en prometedores candidatos para estudios *in vivo*.

2.3.5. Estudios para la determinación del mecanismo de acción en el parásito

Una vez demostrada la actividad leishmanicida y la capacidad de nuestros compuestos de inhibir la *Li-TryR*, decidimos comprobar si la tripanotión reductasa endógena del parásito, podría ser una de las dianas celulares involucradas en la muerte del mismo como consecuencia del tratamiento con nuestros compuestos. Para ello, se diseñaron dos experimentos diferentes que permitirían acotar en torno a la *Li-TryR* los mecanismos biológicos de *L. infantum* afectados tras la administración de nuestros derivados.

- **Análisis de la producción del radical superóxido**

Las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), son moléculas sencillas como H_2O_2 u O_2^- que se generan principalmente durante el metabolismo energético de moléculas más complejas como carbohidratos, lípidos o proteínas. Estas moléculas son fundamentalmente subproductos de la transferencia de electrones a través de la cadena respiratoria hacia el aceptor final O_2 en la síntesis de ATP, aunque también pueden provenir de otras fuentes como la β -oxidación de ácidos grasos, y pueden participar en fenómenos de señalización celular.⁵³

En condiciones normales, las ROS no son especies particularmente tóxicas al no ser demasiado reactivas, no obstante, su interacción con otras moléculas sencillas de nitrógeno puede ocasionar intermedios reactivos de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*, RNS), mucho más peligrosos desde el punto de vista celular. Determinados estímulos extra- e intracelulares pueden hacer que los niveles de ROS y RNS se eleven por encima de sus niveles basales, pudiendo causar un daño significativo en determinadas estructuras celulares.⁵³ A este ambiente celular con elevados niveles de ROS y/o RNS se le denomina comúnmente estrés oxidativo.

Por esta razón, los mecanismos internos de control de los niveles de estas especies son fundamentales para la supervivencia de organismos infectivos como *leishmania*, especialmente en situaciones de estrés oxidativo promovido por ejemplo como respuesta del propio macrófago hospedador a la infección⁵⁴, o por la acción de determinados fármacos como por ejemplo las 8-aminoquinolinas análogas de sitamaquina.⁵⁵

Teniendo en cuenta que la cascada de producción de ROS comienza a partir de la generación del radical superóxido (O_2^-), el grupo del Prof. Antonio Jiménez llevó a cabo la medición de los niveles de esta especie en presencia y en ausencia de nuestros inhibidores, empleando la sonda fluorescente DHE (*dihydroethidium*) como detector ya que se une selectivamente a dicho radical.

Los resultados se muestran en la **Figura 2.11** donde se midió la variación de la intensidad de fluorescencia asociada al radical superóxido, tras la incubación de promastigotes de *L. infantum* con concentraciones crecientes de los compuestos más potentes en los ensayos enzimáticos y de proliferación en cultivo celular **2.26** - **2.28** **2.54**, **2.80** y **2.81**.

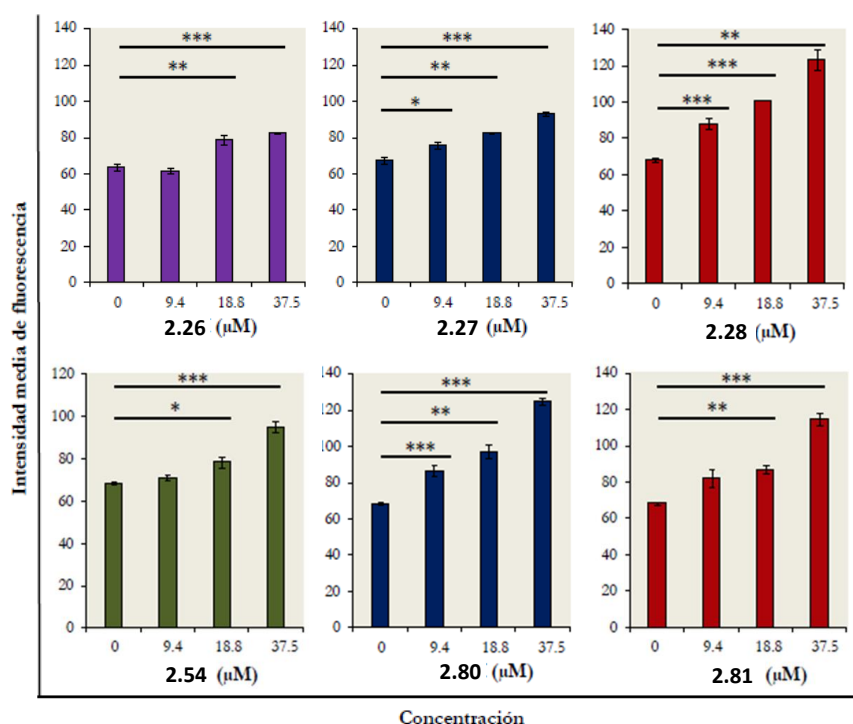


Figura 2.11. Cuantificación de la producción de radical superóxido en promastigotes de *L. infantum* tras el tratamiento con distintas concentraciones de compuesto. *P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001.

Los resultados indicaron un aumento de la cantidad de O_2^- en el interior de los promastigotes como respuesta al tratamiento con todos los compuestos. En todos los casos además, este aumento fue dosis dependiente. Como se puede apreciar en la **Figura 2.11**, el incremento de O_2^- fue especialmente notable en el caso del inhibidor **2.28** ($R_3 = -(CH_2)_2$ Bifenil)

de la **Serie I**, y de las sales de triazolio **2.80** y **2.81** de la **Serie II**, los cuales hicieron que se duplicasen prácticamente los niveles de fluorescencia basal asociado a este radical.

Estos resultados parecen indicar que el equilibrio redox del parásito se ve afectado como consecuencia del tratamiento con estos derivados, acotándose de esta manera el entorno de acción de los mismos en torno a dianas involucradas en el mecanismo redox de protección.

- **Análisis de concentración de tioles**

Una vez sugerido que estos compuestos podrían alterar el equilibrio redox del parásito, el siguiente estudio que se realizó fue el de intentar demostrar que la actividad leishmanicida de nuestros derivados está relacionada con la inhibición de la TryR endógena del parásito. Para ello, se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de tioles intracelulares presentes en el parásito antes y después de inducir un estrés oxidativo artificial, donde la inhibición de la TryR debería causar una disminución de los mismos como consecuencia de la imposibilidad para el parásito de regenerar la forma reducida de los tioles.

Se emplea comúnmente el término tioles para hacer referencia a aquellos agentes intracelulares encargados de capturar especies reactivas de oxígeno a través de su grupo nucleófilo -SH. La cuantificación de estas especies permite relacionar de forma directa la acción de los compuestos con la inhibición de la *Li*-TryR endógena, dado que en la familia de los tripanosomátidos, en general, y en el género *leishmania* en particular, la especie tripanotión es el tiol de bajo peso molecular más abundante en el interior del parásito (1-3 mM en promastigotes), si lo comparamos con otros como el glutatión o el ovotiol A.⁵⁶

Teniendo en cuenta estas premisas, el grupo del Prof. Antonio Jiménez decidió emplear la sonda fluorescente CMFDA (*5-chloromethylfluorescein diacetate*) para cuantificar selectivamente los niveles de estas especies -SH de bajo peso molecular.

En primer lugar, se comprobó la capacidad de bloquear completamente la síntesis *de novo* de tripanotión empleando butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor conocido de la síntesis de glutamil-cisteína, precursor de glutatión y por tanto, en última instancia, precursor también de la molécula de tripanotión⁵⁷ (**Figura 2.12**). El diseño de este experimento permitiría asociar posteriormente una hipotética reducción de los niveles de tioles, con una inhibición de la regeneración de los mismos y no de su biosíntesis.

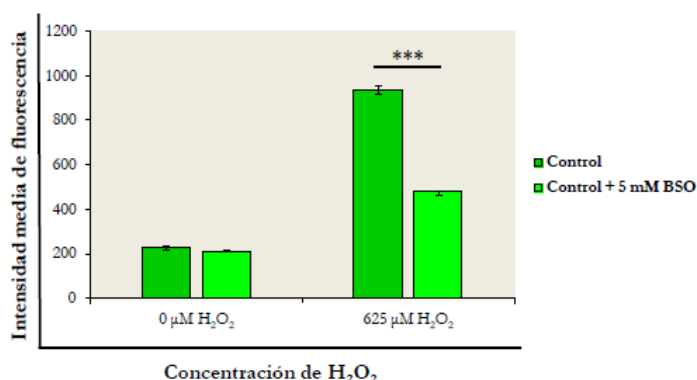


Figura 2.12. Efecto del pretratamiento con una concentración 5 mM de BSO sobre la cantidad de tioles en promastigotes de *L. infantum* tratados o no con 625 μM de H₂O₂ durante 1 hora. *P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001.

El tratamiento inicial de promastigotes de *L. infantum* con H₂O₂ (625 μM) durante una hora, provocó el aumento de tioles hasta concentraciones 5 veces superiores a las normales como consecuencia del estrés oxidativo generado. El pre-tratamiento con BSO (5 mM) como inhibidor indirecto de la síntesis de tripanotión, permitió observar un descenso de aproximadamente el 50% en la concentración final de tioles tras el estímulo inicial. Estos resultados ponen de manifiesto, por un lado el aumento que se produce en la concentración de tioles del parásito en respuesta al estrés oxidativo, y por otro lado, la capacidad del BSO de reducir esos niveles a la mitad.

A continuación, decidimos evaluar la capacidad de nuestros compuestos para afectar a la concentración final de tioles intracelulares libres, combinando el ensayo anterior con el pre-tratamiento con un compuesto representativo de cada serie (**2.28** y **2.81**) a una concentración de 75 μM. Los resultados obtenidos se reflejan en la **Figura 2.13**.

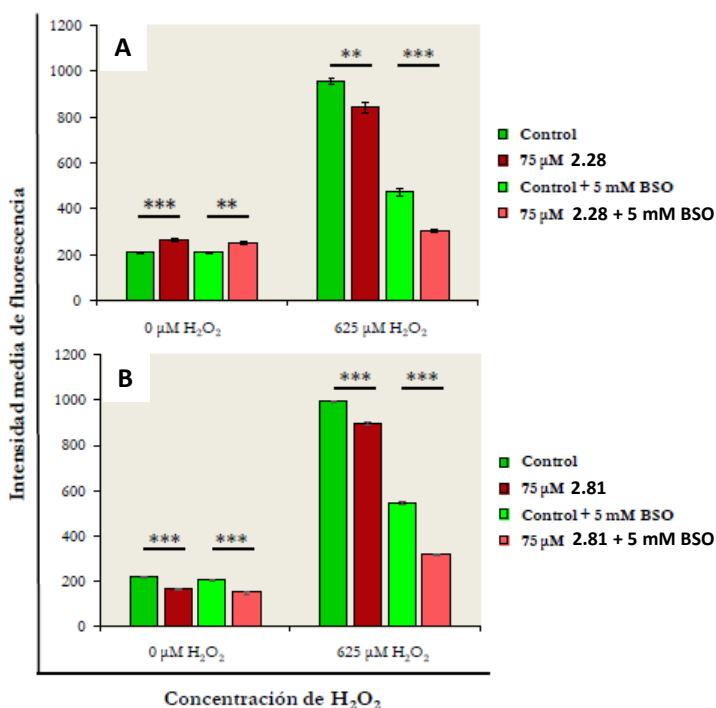


Figura 2.13. Cantidad de tioles reducidos (-SH) en promastigotes de *L. infantum* debida al tratamiento con una concentración 75 μM de los compuestos **2.28** (A) y **2.81** (B) durante 1 hora. *P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001.

El tratamiento inicial de los parásitos con los compuestos **2.28 (Serie I)** y **2.81 (Serie II)**, en ausencia de un estímulo oxidativo artificial (0 μM de H_2O_2), no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de tioles tras la incubación con este compuesto. A pesar de las condiciones oxidantes generadas tras la posterior adición de H_2O_2 (625 μM), la concentración de tioles de parásitos pre-tratados con **2.28/2.81** y BSO se mantuvo por debajo de los niveles correspondientes a la inhibición de la síntesis *de novo* (control + BSO), situándose muy próximos a los niveles presentes inicialmente en ausencia de estrés oxidativo. Este resultado parece indicar que no sólo la biosíntesis de tripanotión sino también la regeneración, está siendo objeto de inhibición por parte de nuestros compuestos.

La incapacidad del parásito para amortiguar el estímulo oxidativo artificial inducido en presencia de los derivados **2.28** y **2.81**, pone de manifiesto la capacidad de los compuestos para inhibir la TryR endógena del parásito como posible mecanismo de acción de estos compuestos.

Estudios recientes de medición de la actividad oxidorreductasa de TryR en lisados celulares de promastigotes pre-tratados durante 1 hora con nuestros compuestos, confirman la reducción de la actividad TryR endógena.

2.4. Conclusiones

El objetivo de este capítulo ha sido la búsqueda de nuevos disruptores del proceso de dimerización de la tripanotión reductasa de *L. Infantum* (Li-TryR), basados en un *scaffold* no descrito de triazol-fenil-tiazol. Este esqueleto se ha propuesto mediante una estrategia de *scaffold hopping* a partir del esqueleto de 5-6-5-imidazol-fenil-tiazol explorado en el **Capítulo 1**, y a partir de él se ha diseñado, sintetizado y evaluado biológicamente una quimioteca de derivados de 5-6-5-triazol-fenil-tiazol (**Serie I**) y una segunda serie de sus correspondientes sales de triazolio (**Serie II**).

La novedad estructural y relevancia de los resultados obtenidos en la evaluación biológica de los compuestos, tanto en ensayos enzimáticos como en cultivo celular, ha dado lugar a la presentación de una patente europea recientemente extendida a PCT.⁵⁸

Los resultados más relevantes se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Desde el punto de vista sintético, se ha llevado a cabo el diseño y preparación de más de 36 derivados con diferentes sustituyentes **R₁**, **R₂**, **R₃** y **R₄**, clasificados en dos categorías en base al esqueleto central: **Serie I** y **Serie II**. Para su obtención se ha optimizado una ruta sintética de entre 7 y 9 etapas de reacción, que ha permitido funcionalizar diferentemente el *scaffold* en las posiciones mencionadas y realizar un estudio cualitativo de relaciones estructura-actividad biológica (SAR).
- En cuanto a la evaluación biológica de los compuestos en ensayos enzimáticos frente a Li-TryR, se han obtenido inhibidores potentes tanto de la actividad oxidorreductasa como del proceso de dimerización de la enzima, mejorándose especialmente con la Serie I y de manera muy significativa, la capacidad desdimerizadora de las estructuras con respecto a los compuestos de imidazol predecesores. Los estudios de SAR de la **Serie I** revelan la importancia de la cadena de butilamino en **R₁**, del grupo imidazolidinona en **R₂**, y de grupos aromáticos voluminosos como naftilo (**2.27**) y bifenilo (**2.28**) en **R₃**, alcanzándose valores CI_{50} dim similares o incluso ligeramente inferiores a los del péptido de referencia **P1**. En cuanto a los compuestos de la **Serie II**, la introducción de una carga positiva adicional en el triazol, se ha traducido, en general, en una mejora de la capacidad inhibitoria de la actividad de la enzima, y en una pérdida de la capacidad desdimerizadora, a excepción del derivado de bifenilo **2.81** para el que se conjugan ambos efectos.
- Todos los inhibidores estudiados resultaron inactivos en el ensayo de actividad oxidorreductasa de la enzima homóloga humana hGR, mientras que los compuestos más potentes en el ensayo de dimerización de Li-TryR **2.27** y **2.28**, fueron aproximadamente 4 veces menos eficaces frente a la desdimerización de la enzima humana, lo que indica una mayor selectividad por la enzima del parásito.

- Se ha calculado y se ha comparado la eficiencia como ligandos de los compuestos descritos en el capítulo, pudiéndose descartar de este estudio relativo por ej. el derivado tricíclico **2.56** para el que un aumento del peso molecular y de lipofilia no ha supuesto un incremento significativo de la potencia desdimerizadora del ligando.
- Del estudio de las propiedades como fármaco se puede concluir en primer lugar que los compuestos obtenidos en este trabajo presentan una solubilidad acuosa muy alta, especialmente en el caso de los derivados de imidazol y de las sales de triazolio. Además, los compuestos presentan unos parámetros de cLogP, TPSA, nAH y nDH dentro o muy próximos a los límites establecidos de acuerdo con los criterios de Lipinski para una adecuada absorción y permeabilidad (administración oral). Sin embargo, el análisis de los parámetros nAR y Fsp³ apunta en cambio, a un exceso de flexibilidad y de aromaticidad en estos derivados. Estos últimos datos suponen un punto de partida para futuras mejoras en estos derivados.
- Ambas series mostraron una actividad leishmanicida potente frente a parásitos extra- e intracelulares, con valores de CE₅₀ en el rango micromolar bajo, lo que demuestra una excelente permeabilidad celular. Los compuestos de la **Serie II** presentaron mejores índices de selectividad que los de la **Serie I** y que los de los imidazoles predecesores, alcanzando valores de IS cercanos a 20 frente a parásito extracelular en el caso del derivado de propilamina **2.85**, y superior a 6 en modelos de amastigotes intracelulares para los mejores compuestos ensayados **2.80** y **2.81**.
- Ensayos de producción del radical superóxido y de niveles de tioles junto con el análisis de la actividad oxidorreductasa de lisados celulares de parásitos pre-tratados con nuestros compuestos, apuntan a que la *Li*-TryR endógena podría ser una de las dianas celulares implicadas en la muerte del parásito como consecuencia del tratamiento con estos derivados.

Todas estas características podrían convertir a estos derivados en buenos candidatos para posteriores estudios *in vivo*.

2.5. ANEXO: Estudio de las propiedades fluorescentes de los compuestos

De manera complementaria al diseño, síntesis y evaluación biológica de los compuestos de esta memoria, en el presente apartado se pretende explorar las propiedades fluorescentes que habían sido observadas tanto para los imidazoles del **Capítulo 1**, como para los triazoles y sales de triazolol del **Capítulo 2**.

La fluorescencia de una molécula es un fenómeno de emisión de luz a una determinada longitud de onda como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética de mayor energía (menor longitud de onda). A la diferencia entre las longitudes de onda de emisión y de absorción se denomina desplazamiento de Stokes ($\Delta\lambda$). Se conoce como fluoróforos a aquellos compuestos capaces de emitir luz tras la excitación con energía de una determinada longitud de onda, mientras que se denomina cromóforo a la parte de la molécula responsable de la absorción, habitualmente sistemas altamente conjugados. La estructura electrónica del cromóforo determina sus propiedades ópticas, mientras que la conjugación con determinados grupos funcionales (auxocromos) puede dar lugar a alteraciones en las longitudes de onda e intensidades de absorción y emisión.

El empleo de sondas fluorescentes basadas en pequeñas moléculas orgánicas, es una poderosa herramienta que se puede aplicar al estudio de procesos biológicos, a la detección y diagnóstico de enfermedades, o al descubrimiento de fármacos entre otros campos.⁶⁰ El fundamento de su aplicación reside en la variación en la emisión de un fluoróforo que se produce como consecuencia de un proceso de unión, de una reacción química o de variaciones en el ambiente celular de la sonda.⁶¹ El empleo de técnicas de espectroscopía y microscopía de fluorescencia, permite analizar con gran sensibilidad estos cambios proporcionando una valiosa fuente de información en el campo de la Química Médica.

Dentro de los esqueletos cromóforos empleados comúnmente como sondas fluorescentes, destacan entre otros las naftalimidias, la fluoresceína y sus análogos, las cumarinas o los BODIPYs (**Figura 2.14**).

Los parámetros ópticos más importantes que definen las características de una sonda fluorescente son el coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción (ϵ), el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ), y las longitudes de onda de los máximos de absorción (λ_{abs}) y de emisión (λ_{em}). El coeficiente de absortividad molar (ϵ) es el parámetro que mide la eficiencia de una molécula para absorber la luz irradiada. La longitud de onda a la que se produce esa absorción máxima se indica como λ_{abs} . El rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) por su parte, es el cociente entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos, es decir, es un parámetro que mide la eficiencia de un fluoróforo para transformar la energía lumínica absorbida en emisión de luz. Esta emisión es máxima a una determinada longitud de onda que se identifica como λ_{em} .

Naftalimidás (amarillo lucifer CH)	Fluoresceínas (fluoresceína)	Cumarinas (Cumarina 314)	BODIPYs (BODIY FL NHS ester)
ϵ : 12000 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϕ : 0.21 (H ₂ O) λ_{abs} : 428 nm λ_{em} : 534 nm	ϵ : 92300 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϕ : 0.97 (EtOH) λ_{abs} : 500 nm λ_{em} : 541 nm	ϵ : 24200 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϕ : 0.68 (EtOH) λ_{abs} : 426 nm λ_{em} : 480 nm	ϵ : 80000 M ⁻¹ cm ⁻¹ ϕ : 0.97 (MetOH) λ_{abs} : 503 nm λ_{em} : 509 nm

Figura 2.14. Ejemplos de compuestos empleados como sondas fluorescentes. Coeficiente de absorptividad molar (ϵ), rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) y longitudes de onda de los máximos de absorción (λ_{abs}), y de emisión (λ_{em}). En rojo se representa la parte cromófora de la molécula.

Con el fin de explorar el potencial como sondas fluorescentes de los derivados de imidazol y triazol de los **Capítulos 1 y 2**, consideramos interesante realizar un estudio comparativo en colaboración con el grupo del Prof. Guillermo Orellana de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), de las propiedades fotofísicas de los compuestos más representativos de cada esqueleto. Aunque las propiedades fluorescentes del esqueleto de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol ya habían sido mencionadas por Hamilton y colaboradores⁶², decidimos incluirlo en el estudio ya que los autores no habían profundizado en la descripción de estas características. Por otro lado, las propiedades fluorescentes tanto de los derivados de triazol como de las sales de triazolio observadas a lo largo del proyecto, resultaban especialmente interesantes por tratarse de nuevos fluoróforos no descritos hasta la fecha.

2.5.1. Caracterización fotofísica de los compuestos de referencia de cada tipo de esqueleto

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron como ejemplo representativo de cada una de las series el imidazol **1.32**, el triazol **2.26** de la **Serie I** y la sal de triazolio **2.79** de la **Serie II**. La caracterización fotofísica de los compuestos se realizó mediante espectroscopia de absorción UV/Visible y de fluorescencia. Primeramente, se registraron los espectros de absorción y de emisión de los compuestos en CH₃CN (**Figura 2.15**). A partir del espectro de absorción se determinaron las longitudes de onda del máximo de absorción (λ_{abs}) y los coeficientes de absorptividad molar (ϵ). Posteriormente, a partir de los espectros de emisión se determinaron las longitudes de onda del máximo de emisión (λ_{em}), y se calcularon los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ), empleando como patrón de referencia una disolución acuosa 0.1 N de sulfato de quinina (SQ) en H₂SO₄.

En la **Figura 2.15** se recogen, además de las estructuras, los espectros y los parámetros ópticos obtenidos para cada uno de los compuestos.

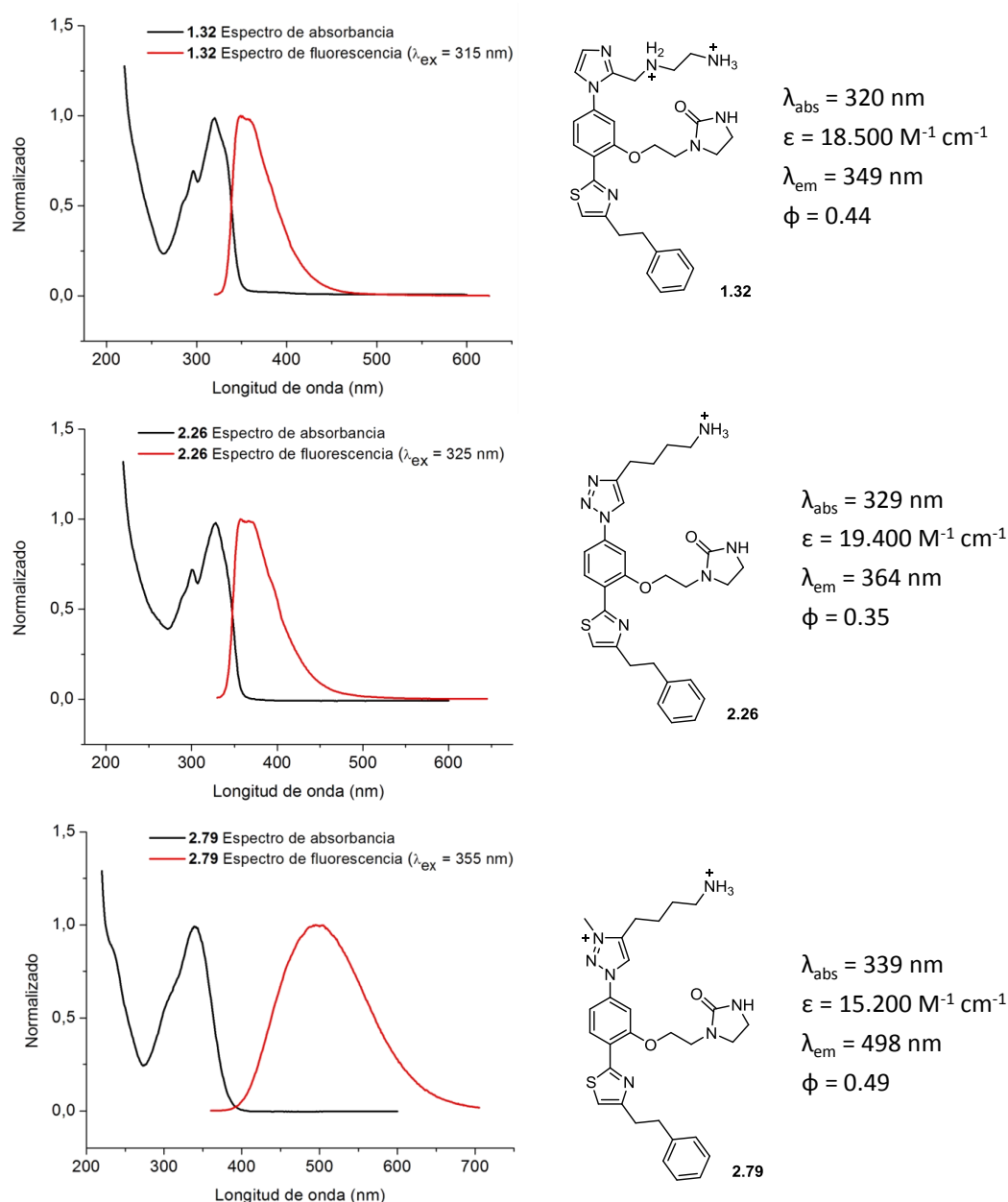


Figura 2.15. Estructuras químicas y espectros de absorción (**negro**), de emisión (**rojo**) y parámetros ópticos de los compuestos de referencia de cada tipo de esqueleto **1.32**, **2.26** y **2.79**.

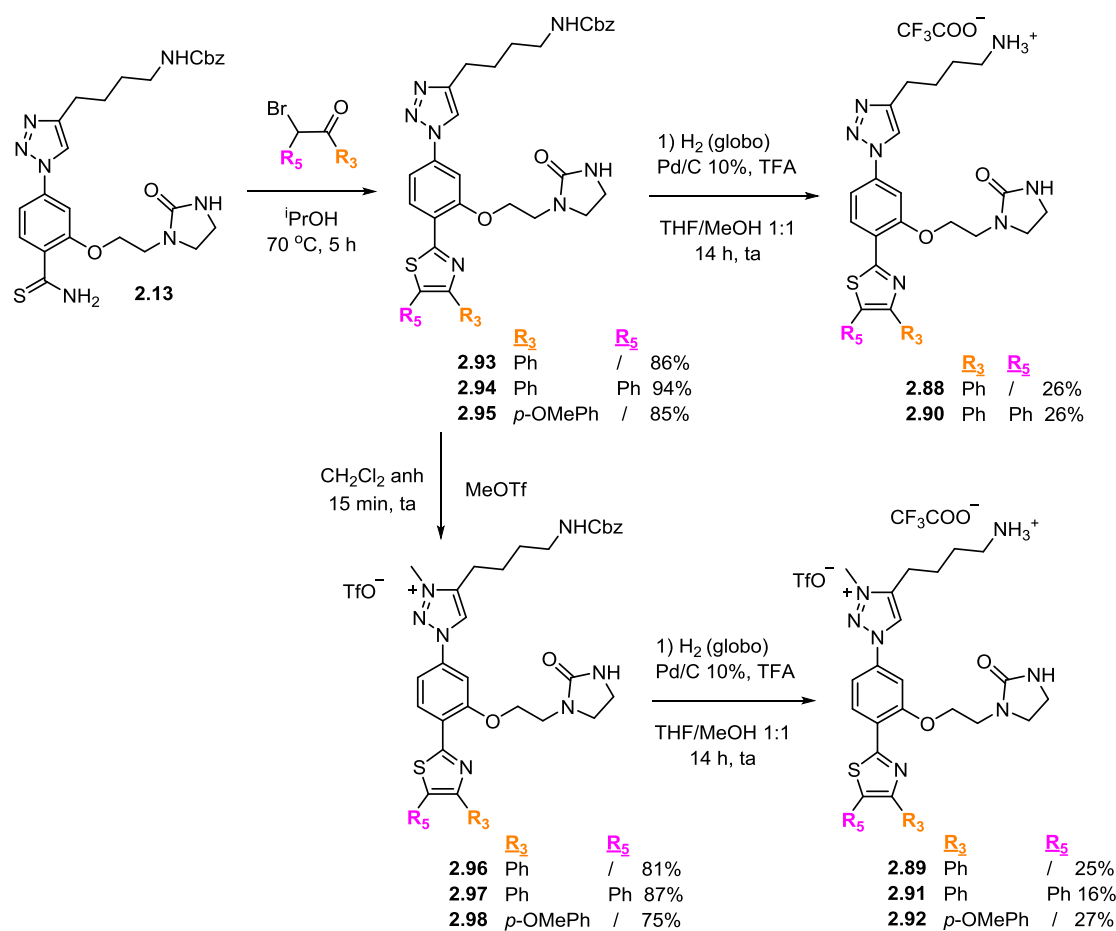
Los compuestos presentaron una absorción (λ_{abs}) comprendida entre 320 y 339 nm, con unos coeficientes de absortividad molar de entre $15.200 - 19.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y no se observaron diferencias muy significativas entre ellos. Sí se observó un comportamiento diferente en los procesos de emisión donde el imidazol **1.32** y el triazol **2.26** presentaron longitudes de onda de emisión (λ_{em}) en torno a 350 nm en la región del azul, mientras que la sal de triazolio **2.79** emite a una λ_{em} de 498 nm en la zona del verde. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia calculados empleando como patrón de referencia una disolución 0.1N de sulfato de quinina (SQ) en H_2SO_4 , estuvieron comprendidos entre 0.35 y 0.49.

2.5.2. Diseño, síntesis y caracterización fotofísica de nuevos derivados de triazol con sustituyentes conjugados en el esqueleto central

Seguidamente, decidimos estudiar el efecto de los sustituyentes en la fluorescencia de los compuestos. Así, elegimos el derivado **2.11** previamente sintetizado y sustituido en **R₃** con un grupo aromático no conjugado directamente con el esqueleto central, al igual que el imidazol **1.32** y el triazol de referencia **2.26**, como control negativo. Por otro lado nos planteamos el diseño de compuestos sustituidos con anillos aromáticos directamente unidos al esqueleto central de las **Serie I** y **II**. De esta manera decidimos sintetizar los compuestos **2.88** y **2.89**, portadores de grupos fenilo en posición **R₃** (**Esquema 2.20**). Con la misma finalidad, se decidió explorar una nueva posición (**R₅**) correspondiente a la posición 5- del anillo de triazol mediante la preparación y caracterización de los compuestos **2.90** y **2.91** (**Esquema 2.20**). Con este tipo de sustituciones se pretendía, además del estudio de la influencia de dichos sustituyentes en la absorción y emisión de los fluoróforos, un desplazamiento de la emisión a mayores longitudes de onda.

Finalmente, teniendo en cuenta la posible distribución de cargas que se da en las sales de triazolio de la **Serie II**, en las que el anillo de triazol posee deficiencia electrónica como resultado de su carga formal positiva, nos planteamos la preparación del compuesto **2.92** (**Esquema 2.20**), portador en **R₃** de un anillo aromático directamente unido, sustituido a su vez con un grupo fuertemente electro-donador -OMe en posición *-para* que podría dar lugar a una mayor distribución de cargas en la molécula y por tanto a un desplazamiento batocrómico de la longitud de onda del máximo de emisión.

La síntesis de los nuevos fluoróforos propuestos **2.88** - **2.92** a partir de la tioamida intermedia **2.13** y de las correspondientes bromoarilcetonas comerciales, se realizó siguiendo la misma metodología empleada en el **Capítulo 2** (**Esquema 2.20**). La síntesis de los compuestos. A partir de la tioamida **2.13** se llevó a cabo la ciclación de Hantzsch de triazoles empleando distintas bromocetonas comerciales 2- ó 1,2-disustituidas obteniéndose los intermedios protegidos **2.93** - **2.95** con elevados rendimientos (cerca al 90%). A continuación, la hidrogenólisis de los intermedios **2.93** y **2.94** empleando Pd/C al 10 % como catalizador en medio ácido de TFA, permitió obtener los productos finales de la **Serie I** (**2.88** y **2.90**). Por otro lado, se llevó a cabo la metilación de los intermedios **2.93** - **2.95** con MeOTf para dar lugar a las sales de triazolio protegidas **2.96** - **2.98** con buenos rendimientos. Por último, la desprotección con H₂ (globo) en presencia de Pd/C al 10% como catalizador y TFA, condujo a las sales de triazolio **2.89**, **2.91** y **2.92** de la **Serie II**.



Esquema 2.20. Síntesis de los derivados **2.88** - **2.92** diseñados para el estudio de las propiedades fluorescentes de los fluoróforos de 5-6-5 triazol-fenil-tiazol y sus sales de triazolío.

Una vez obtenidos los nuevos fluoróforos **2.88** - **2.92**, se compararon sus propiedades ópticas con las de los compuestos de cada serie comentados anteriormente (**1.32**, **2.26** y **2.79**) mediante el análisis de los espectros normalizados de absorción (**Figura 2.16**) y emisión (**Figura 2.17**).

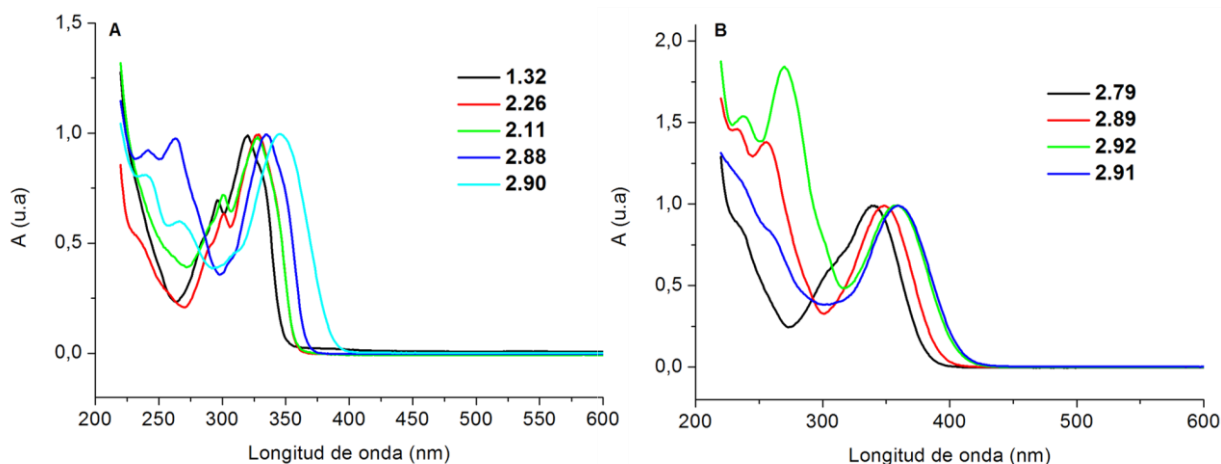


Figura 2.16. Espectros normalizados de absorción en CH₃CN de los compuestos **A)** imidazol **1.32** y triazoles **2.11**, **2.26**, **2.88** y **2.90**; **B)** Sales de triazolío **2.79**, **2.89**, **2.91** y **2.92**.

Los nuevos fluoróforos analizados **2.88** - **2.92**, mostraron espectros de absorción desplazados entre 6 y 21 nm hacia al rojo con respecto a **2.26** (**Serie I**) y a **2.79** (**Serie II**). Destacaron especialmente en cada una de las series los compuestos **2.90** y **2.91**, portadores de grupos fenilo directamente conjugados en **R₃** y **R₅**, ya que presentaron los valores de λ_{abs} más altos. El triazol **2.11**, con un sustituyente bencilo en **R₃** no conjugado al esqueleto cromóforo, mostró como cabía esperar el mismo perfil que **2.26**.

En cuanto a los espectros de fluorescencia, se observó que los nuevos fluoróforos sintetizados con grupos unidos directamente al esqueleto central, emitieron a longitudes de onda más altas que la del compuesto de referencia **2.26** en el caso de la **Serie I** (desplazamiento entre 20 y 35 nm), y de **2.79** en el caso de la **Serie II** (desplazamiento entre 32 y 49 nm).

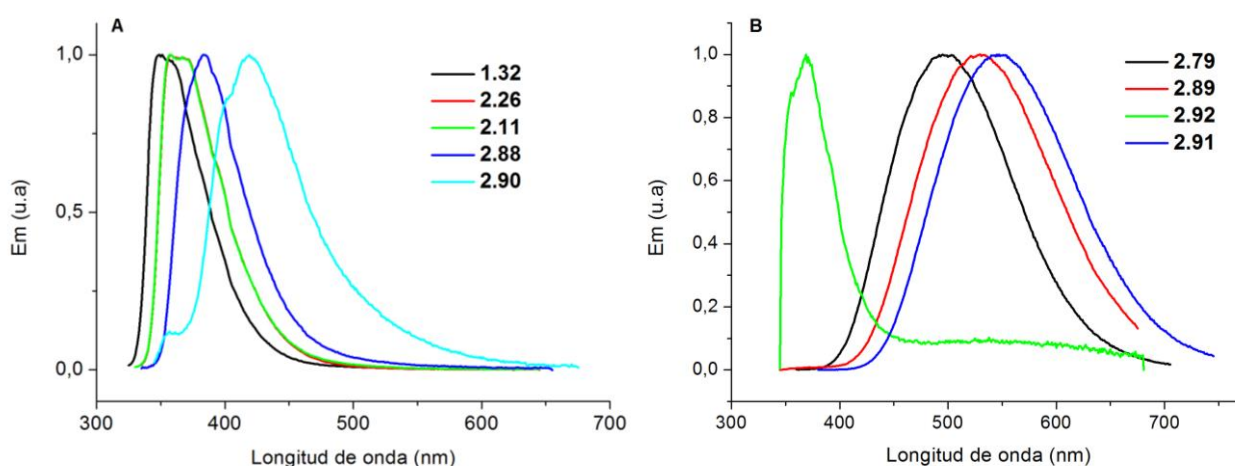
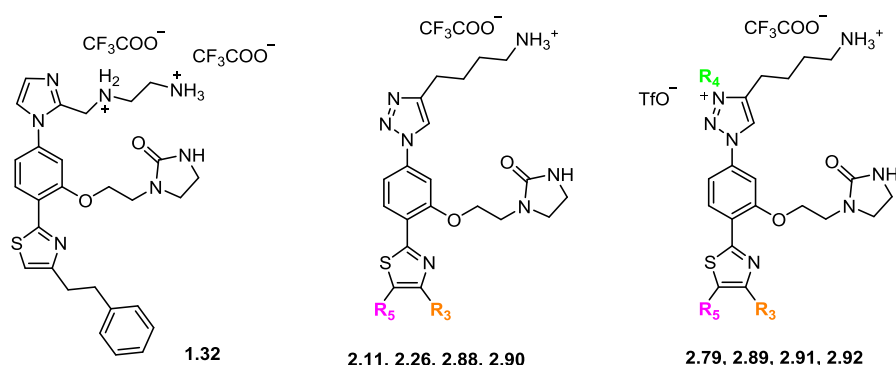


Figura 2.17. Espectros normalizados de emisión en CH_3CN de los compuestos **A)** imidazol **1.32** y triazoles **2.11**, **2.26**, **2.88** y **2.90**; **B)** sales de triazolio **2.79**, **2.89**, **2.91** y **2.92**.

Los derivados disustituídos en el tiazol **2.90** y **2.91** fueron los compuestos que presentaron las bandas de emisión a longitudes de onda menos energéticas.

A partir de los espectros de absorción y emisión en CH_3CN anteriores, se llevó a cabo la determinación de los coeficientes de extinción molar (ϵ) y del rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ) de los compuestos **2.11**, **2.88** - **2.92** que se recogen en la **Tabla 2.10**. Junto con los valores de los nuevos compuestos se muestran los de los compuestos **1.32**, **2.26** y **2.79** comentados anteriormente que se utilizan como referencia para cada tipo de fluoróforo. Además, se muestran las longitudes de onda del máximo de absorción (λ_{abs}) y de emisión (λ_{em}) así como el desplazamiento de Stokes ($\Delta\lambda$) de cada compuesto.

Tabla 2.10. Valores de longitud de onda del máximo de absorción (λ_{abs}), coeficiente de absorptividad molar (ϵ), longitud de onda del máximo de emisión (λ_{em}) y rendimiento cuántico (ϕ), determinados en CH_3CN para los fluoróforos de ambas series.



Compuesto	R ₃	R ₄	R ₅	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm) ^b	ϵ (M ⁻¹ , cm ⁻¹) ^b	Φ
SQ ^a	/	/	/	345	457	112	10564	0.58
1.32	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	320	349	29	18500	0.44
2.26	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	329	364	35	19400	0.35
2.11	-CH ₂ -Ph	/	/	329	364	35	11200*	0.35
2.88	-Ph	/	/	335	384	49	24500	0.10
2.90	-Ph	/	-Ph	346	419	73	25800	0.05
2.79	-(CH ₂) ₂ -Ph	-Me	/	339	498	159	15200	0.49
2.89	-Ph	-Me	/	348	530	182	14857	0.55
2.91	-Ph	-Me	-Ph	360	547	187	21500	0.46
2.92	-(p-OMe)Ph	-Me	/	358	369	11	11300	0.02

^a Sulfato de quinina; ^b Desplazamiento de Stokes; ^c Coeficiente de absorptividad molar a la λ_{abs} . ^b Rendimiento cuántico de fluorescencia. * La solubilidad en CH_3CN no es completa y el dato es aproximado.

Según se observa en la tabla anterior, todos los compuestos presentaron una absorción centrada en la región comprendida entre 320 y 360 nm, correspondiente a longitudes de onda de la banda ultravioleta del espectro visible. Sin embargo, las bandas de emisión fueron muy diferentes en función de la serie de triazol, siendo el desplazamiento de Stokes de los compuestos de la **Serie I** mucho menor que en el caso de la **Serie II**, observándose diferencias entre las longitudes de onda de emisión y de absorción de hasta 187 nm en el caso para el compuesto **2.91**. En lo que respecta a los coeficientes de absorptividad molar de ambas series, se observó que éstos variaron entre 11000 y 25800 M⁻¹ cm⁻¹ y fueron mayores cuanto mayor es número de electrones π del sistema, siendo máximo para el compuesto disustituido en el triazol **2.90**. Estos valores de ϵ son similares, o incluso superiores por ejemplo, a los que

presenta la naftalimida amarillo de lucifer ($\epsilon = 12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) descrita como ejemplo de sonda fluorescente. Sin embargo, la variación del rendimiento cuántico de fluorescencia resultó fuertemente dependiente de la serie de triazol analizada, ya que mientras que el aumento de conjugación tiene un efecto negativo en el rendimiento cuántico de los compuestos de la **Serie I** (0.10 para **2.88** y 0.05 para **2.90**) con respecto al esqueleto prototipo de **2.26** ($\phi = 0.35$), en la **Serie II** la hiperconjugación dio lugar a rendimientos cuánticos similares (**2.91**, $\phi = 0.46$) o incluso superiores (**2.89**, $\phi = 0.55$) con respecto a **2.79** ($\phi = 0.49$). En contra de lo esperado, la introducción de un grupo fuertemente electrón-dador como el -OMe en posición -*para* del fenilo en **R₃**, condujo a una pérdida total de la fluorescencia para el compuesto **2.92** ($\phi = 0.02$, $\lambda_{\text{em}} = 369 \text{ nm}$), que sólo presentó una emisión residual en la región del azul.

Esta pérdida de fluorescencia y de la banda característica de emisión de la sal **2.92** parece indicar que la posición 4- del anillo de triazol (**R₃**), no es una posición adecuada para aumentar la distribución de cargas dentro de la molécula con la introducción de grupos electro-dadores y por tanto, se requiere un estudio mecanístico más detallado que permita entender y seguir mejorando las propiedades fluorescentes de estos compuestos.

A la vista de estos resultados, hay que destacar también junto con los elevados desplazamientos de Stokes de los compuestos de la **Serie II** (superiores a 150 nm), la anchura de las bandas de emisión de los mismos con respecto al imidazol **1.32** o a los triazoles de la **Serie I**. Este hecho podría deberse a la diferente estructura de los fluoróforos donde la distribución de cargas parece estar más favorecida en el caso de las sales de triazolio que en el de los heterociclos neutros.

La irradiación de una molécula fluorescente a una determinada longitud de onda, induce la formación de un estado excitado desde el estado fundamental (*Ground State*, GS), cuya relajación radiativa da lugar a la emisión de luz a una longitud de onda generalmente mayor que la empleada en la excitación. Cuando ese estado excitado se corresponde con una estructura molecular donde existe una separación de cargas, a la banda resultante se la denomina banda de transferencia de carga (*Charge Transfer*, CT). En cambio, cuando no se produce separación de cargas tras la excitación, al estado excitado resultante desde el que se produce la relajación emisiva se le denomina LE (*Locally Excited*). Las bandas LE suelen ser más definidas y se sitúan más próximas en energía a la excitación (menor $\Delta\lambda$), mientras que las bandas CT se generan tras la pérdida previa de energía en forma de relajaciones no emisivas y por tanto, presentan mayores desplazamientos de Stokes y se caracterizan por una anchura mayor de la señal de emisión.

De acuerdo con esta descripción, los fluoróforos de imidazol (**1.32**) y de triazol de la **Serie I** (**2.11**, **2.26**, **2.88** y **2.90**), parecen emitir desde una banda LE, mientras que las sales de triazolio de la **Serie II** (**2.79**, **2.89** y **2.91**) se caracterizan por poseer una banda CT.

Las bandas CT, dado que corresponden a estados donde existe separación de cargas, suelen verse influidas en mayor medida por efecto disolvente (efecto solvatocrómico). Por ese motivo decidimos estudiar la influencia de la naturaleza del disolvente en las propiedades fluorescentes de los compuestos disustituídos en el triazol **2.90** (Serie I) y **2.91** (Serie II) llevando a cabo la obtención de los espectros de emisión en dioxano, THF y CH₃CN (**Figura 2.18**).

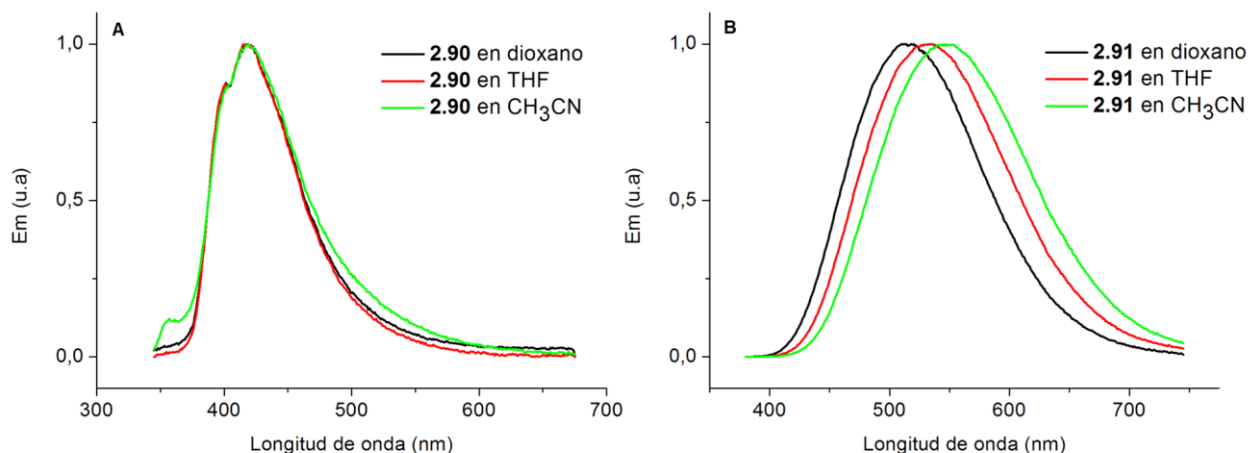


Figura 2.18. Espectros normalizados de emisión en dioxano, THF y CH₃CN de los compuestos: **A: 2.90**; **B: 2.91**.

En estos experimentos no se observó un efecto solvatocrómico en el caso del triazol **2.90** de la **Serie I**, pero sí se observó el desplazamiento del máximo de emisión hacia longitudes de onda mayores para el análogo **2.91** de la **Serie II**, a medida que aumenta tanto el momento dipolar del disolvente (μ) como la constante dieléctrica (ϵ): CH₃CN ($\mu = 3.92$, $\epsilon = 37.5$) > THF ($\mu = 1.75$, $\epsilon = 7.58$) > dioxano ($\mu = 0.45$, $\epsilon = 2.25$).⁶³

Este hecho sumado al notable desplazamiento de Stokes de las bandas de emisión junto con la anchura de las mismas, concuerda con la hipótesis de que en el caso de las sales de triazolio estamos ante una emisión de fluorescencia desde una banda de transferencia de carga CT.

Desde un punto de vista espectrofotométrico y relacionando las propiedades fluorescentes de estos compuestos con su posible aplicación como sondas, las regiones energéticas del espectro visible en la que emiten estos compuestos (azul) podría limitar su aplicación debido a las múltiples especies biológicas inespecíficas presentes en un organismo que absorben a esas longitudes de onda y que podrían *quenchear* la fluorescencia de los compuestos. Otro problema relacionado con la emisión en esta región del espectro, sería la elevada energía asociada a la longitud de onda de excitación que habría que aplicar para medir la emisión de fluorescencia, lo cual podría causar problemas de fotoestabilidad. No obstante los fluoróforos que emiten en regiones correspondientes a bajas longitudes de onda presentan un interés creciente en áreas de investigación relacionadas con sistemas de

transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) o en diodos orgánicos emisores de luz (*Organic Light-Emitting Diode*, OLED).

No obstante, los resultados comentados en este apartado ponen de manifiesto que es posible la modulación de las propiedades fluorescentes de estos nuevos fluoróforos, tanto en función del tipo de esqueleto (imidazol, triazol o sal de triazolio) como de la posición de los grupos directamente conjugados al esqueleto central. Las sales de triazolio presentan una banda de emisión CT centrada a mayores longitudes que las bandas de emisión LE de la **Serie I** de los triazoles y del imidazol, siendo los compuestos **2.82** ($R_3 = \text{Ph}$) y **2.83** ($R_3 = R_5 = \text{Ph}$) de la **Serie II**, los fluoróforos más destacables que muestran longitudes de onda de emisión en la región del verde (495 - 570 nm), y presentan buenos rendimientos cuánticos en torno al 50%.

2.5.3. Evaluación biológica de los nuevos fluoróforos

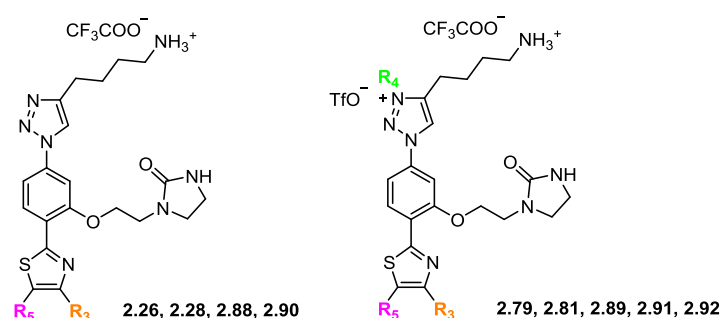
- **Ensayos enzimáticos**

Una vez realizada la caracterización fotofísica tanto de los compuestos más representativos de los **Capítulos 1 y 2** en este sentido, como de los nuevos derivados sintetizados para los estudios de fluorescencia, decidimos llevar a cabo en primer lugar la evaluación biológica de estos últimos en ensayos enzimáticos frente a *Li-TryR* de manera análoga a como se ha descrito en los apartados anteriores. Los resultados se recogen en la **Tabla 2.11** donde se incluyen con fines comparativos los inhibidores de referencia **2.26** y **2.28** de la **Serie I** y **2.79** de la **Serie II**.

En primer lugar analizando los nuevos triazoles de la **Serie I** cabe destacar la potencia inhibitoria del derivado disustituido en el triazol con dos grupos fenilo **2.90**, tanto en el ensayo de actividad como en el de dimerización, observándose valores de Cl_{50} similares a los del mejor inhibidor enzimático de la serie del triazol obtenido hasta este momento **2.28**. La actividad inhibitoria de este derivado fue muy superior a la del derivado monosustituido **2.88**.

En cuanto a las nuevas sales de triazolio de la **Serie II** en el ensayo de actividad, también el compuesto disustituido con dos grupos fenilo **2.91** resultó un inhibidor más potente que el derivado monosustituido **2.89** con valores de Cl_{50} act similares a los de la sal de triazolio de referencia **2.79**. Cabe asimismo destacar el compuesto **2.92** en el que la introducción de un grupo OMe en el fenilo dio lugar a actividades 4 veces superiores a las del análogo sin sustituir **2.89**. En el ensayo de dimerización, estas tres nuevas sales de triazolio siguieron el comportamiento general no presentando efecto desdimerizador.

Tabla 2.11. Datos biológicos frente a *Li-TryR* de los nuevos compuestos **2.88** - **2.92** diseñados para estudios de fluorescencia. Los datos se comparan frente a los inhibidores prototipo **2.26** y **2.28** de la *Serie I*, y **2.79** de la *Serie II*. Se recogen los valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).



Comp	R ₃	R ₅	R ₄	CI ₅₀ act (μM) ^a	CI ₅₀ dim (μM) ^a
2.26	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	14.6 \pm 1.0	38.1 \pm 1.2
2.28	-(CH ₂) ₂ -Naftil	/	/	5.9 \pm 1.1	5.1 \pm 1.3
2.79	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	Me	5.2 \pm 0.8	>200
2.88	-Ph	/	/	24.0 \pm 1.7	30.1 \pm 1.4
2.90	-Ph	-Ph	/	5.8 \pm 1.6	4.2 \pm 1.9
2.89	-Ph	/	Me	22.8 \pm 1.0	>200
2.91	-Ph	-Ph	Me	9.3 \pm 0.9	>200
2.92	-(<i>p</i> -OMe)Ph	/	Me	5.4 \pm 1.6	>200

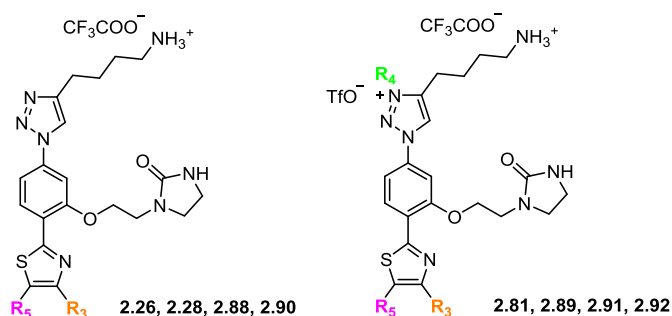
^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la actividad enzimática o la formación del dímero.

De estos resultados se desprende el potencial del compuesto **2.90** disustituido con dos grupos fenilo en el anillo de tiazol, en el que la introducción de un grupo Ph en la posición C5 del tiazol (**R₅**) inexplorada hasta el momento en los estudios de SAR, ha dado lugar a uno de los disruptores de dimerización de *Li-TryR* más potentes, al nivel del mejor disruptor de dimerización obtenido hasta el momento **2.28**. Esta información podría ser de utilidad para el diseño de futuros derivados.

• Ensayos frente a parásitos extracelulares

Una vez realizados los ensayos enzimáticos frente a *Li-TryR* de los nuevos compuestos diseñados para estudios de fluorescencia se procedió a su evaluación en cultivo celular frente a parásitos extracelulares de *L. infantum* y frente a células humanas. Los resultados se recogen la **Tabla 2.12** donde se comparan los valores obtenidos para los nuevos derivados con los de los compuestos de referencia **2.26** y **2.28** de la *Serie I* y **2.81** de la *Serie II*.

Tabla 2.12. Datos biológicos frente parásitos extracelulares de los nuevos compuestos **2.88** - **2.92** diseñados para estudios de fluorescencia. Los datos se comparan frente a los inhibidores prototipo de la **Serie I 2.26** y **2.28** y de la **Serie II 2.81**. Se recogen los valores de $CE_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).



Comp	R_3	R_5	R_4	CE_{50} promastigotes (μM) ^a	CE_{50} amastigotes (μM) ^a	CE_{50} HepG2 (μM) ^a	IS ^b
2.26	-(CH ₂) ₂ -Ph	/	/	30.5 \pm 0.2	13.0 \pm 0.6	30.1 \pm 3.1	1.0/2.3
2.28	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	/	4.9 \pm 0.4	11.6 \pm 0.8	60.0 \pm 2.5	12.2/5.2
2.81	-(CH ₂) ₂ -Bifenil	/	Me	17.6 \pm 1.8	11.1 \pm 0.9	≥ 75	$\geq 4.3/\geq 6.8$
2.88	-Ph	/	/	5.4 \pm 0.1	SD ^c	16.4 \pm 2.3	3.0/SD ^c
2.90	-Ph	-Ph	/	10.7 \pm 1.3	17.0 \pm 4.5	30.4 \pm 6.2	2.8/1.8
2.89	-Ph	/	Me	21.1 \pm 1.2	SD ^c	≥ 75	$\geq 3.5/SD^c$
2.91	-Ph	-Ph	Me	SD ^c	12.9 \pm 1.5	≥ 75	SD ^c / ≥ 5.8
2.92	-(p-OMe)Ph	/	Me	SD ^c	18.5 \pm 2.4	≥ 75	SD ^c / ≥ 4.1

^a Concentración que causa una disminución del 50% de la concentración de parásitos o de células humanas; ^b Índice de selectividad frente a promastigote/amastigote; ^c Sin determinar.

Todos los compuestos sintetizados para los estudios de fluorescencia mostraron actividad leishmanicida en el rango micromolar, con valores similares a los compuestos de referencia. Dentro de la cada una de las series, mientras que los compuestos **2.88** y **2.90** de la **Serie I** presentaron índices de selectividad de 2 - 3, las nuevas sales de triazolio **2.89**, **2.91** y **2.92** de la **Serie II** (de igual forma que la sal de referencia **2.81**) no mostraron citotoxicidad frente a las células humanas HepG2 a la mayor concentración ensayada de 75 μM , exhibiendo IS superiores a los de la **Serie I**.

2.5.4. Estudio de la capacidad de penetración celular en promastigotes de *L. infantum*

Finalmente, decidimos aprovechar la fluorescencia intrínseca de los compuestos para estudiar su internalización dentro del parásito mediante microscopía de fluorescencia. Para ello se eligió el triazol **2.26** como ejemplo representativo de la **Serie I**. No se llevó a cabo ningún experimento con sales de triazolio puesto que no se disponía del filtro necesario para obtener imágenes en la zona del verde.

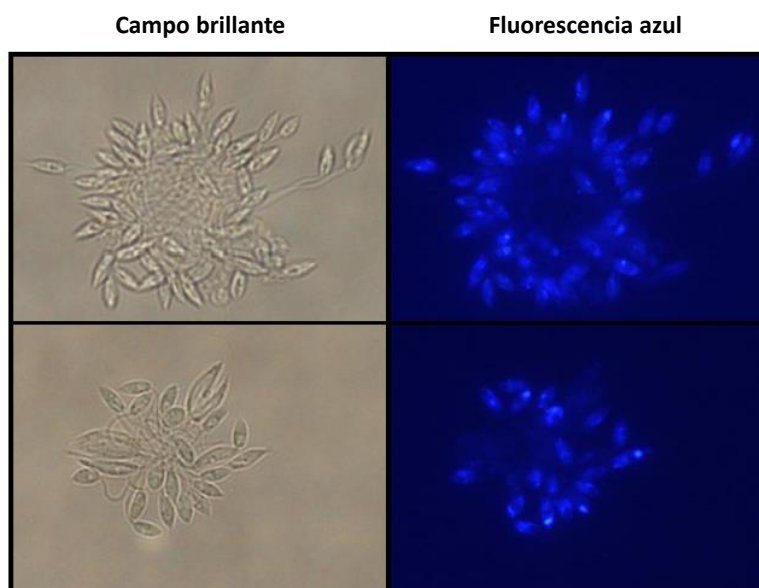


Figura 2.19. Estudio de la capacidad de penetración celular del compuesto **2.26** en promastigotes de *L. infantum* mediante microscopía de fluorescencia al cabo de 1 hora de incubación de los parásitos con el compuesto.

Así, la incubación del derivado **2.26** con promastigotes de *L. infantum* a concentraciones de 25 μM de compuesto durante 1 hora, permitió comprobar mediante microscopía (**Figura 2.19**) la fluorescencia observada en el interior de los parásitos que confirmó la capacidad del compuesto de atravesar la membrana plasmática en este caso de los promastigotes. Estos resultados ilustran la ventaja que supone tener compuestos con fluorescencia intrínseca, de cara a una visualización dentro del parásito a diferencia de los péptidos y peptidomiméticos anteriores en los que fue necesario el uso de sondas fluorescentes.

2.6. Bibliografía

- (1) Böhm, H. J.; Flohr, A.; Stahl, M. Scaffold hopping. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, 1 (3), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.10.009>.
- (2) Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. “Scaffold-hopping” by topological pharmacophore search: A contribution to virtual screening. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, 38 (19), 2894–2896. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19991004\)38:19<2894::AID-ANIE2894>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19991004)38:19<2894::AID-ANIE2894>3.0.CO;2-F).
- (3) Hu, Y.; Stumpfe, D.; Bajorath, J. Recent advances in scaffold hopping. *J. Med. Chem.* **2017**, 60 (4), 1238–1246. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01437>.
- (4) Noble, S.; Langtry, H. D.; Lamb, H. M. Zopiclone. *Drugs* **1998**, 55 (2), 277–302. <https://doi.org/10.2165/00003495-199855020-00015>.
- (5) George, P.; Rossey, G.; Depoortere, H.; Mompon, B.; Allen, J.; Wick, A. Zolpidem and related compounds synthesis, physical properties and structure-activity relationships. *L E R S (Laboratoires D’études Rech. Synthelabo) Monogr. Ser. Vol 6 Imidazopyridines Sleep Disord.* **1988**, 22–2419864001124.
- (6) Beer, B.; Clody, D. E.; Mangano, R.; Levner, M.; Mayer, P.; Barrett, J. E. A Review of the preclinical development of Zaleplon, a novel non-benzodiazepine hypnotic for the treatment of insomnia. *Vol. 3*.
- (7) Lednicer, D. Tracing the origins of COX-2 inhibitors. *Curr Med Chem.* **2002**, 9 (15), 1457–1461.
- (8) Hart, F. D.; Boardman, P. L. Indomethacin: A new non-steroid anti-inflammatory agent. *British Medical Journal.* **1963**, 2 (5363): 965–970. doi:10.1136/bmj.2.5363.965.
- (9) Patil, V.; Guerrant, W.; Chen, P. C.; Gryder, B.; Benicewicz, D. B.; Khan, S. I.; Tekwani, B. L.; Oyelere, A. K. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18 (1), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.042>.
- (10) Tahghighi, A.; Razmi, S.; Mahdavi, M.; Foroumadi, P.; Ardestani, S. K.; Emami, S.; Kobarfard, F.; Dastmalchi, S.; Shafiee, A.; Foroumadi, A. Synthesis and Anti-Leishmanial Activity of 5-(5-Nitrofur-2-yl)-1,3,4-Thiadiazol-2-Amines Containing N-[(1-Benzyl-1H-1,2,3-Triazol-4-yl)methyl] Moieties. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 50, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.01.046>.
- (11) Guimarães, T. T.; Pinto, M. do C. F. R.; Lanza, J. S.; Melo, M. N.; do Monte-Neto, R. L.; de Melo, I. M. M.; Diogo, E. B. T.; Ferreira, V. F.; Camara, C. A.; Valença, W. O. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - and nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 63, 523–530. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.02.038>.
- (12) Suryawanshi, S. N.; Tiwari, A.; Kumar, S.; Shivahare, R.; Mittal, M.; Kant, P.; Gupta, S. Chemotherapy of leishmaniasis. Part XII: Design, synthesis and bioevaluation of novel triazole integrated phenyl heteroterpenoids as antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23 (10), 2925–2928. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.055>.
- (13) Dheer, D.; Singh, V.; Shankar, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorg. Chem.* **2017**, 71, 30–54. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.010>.

- (14) Uliassi, E.; Piazza, L.; Belluti, F.; Mazzanti, A.; Kaiser, M.; Brun, R.; Moraes, C. B.; Freitas-Junior, L. H.; Gul, S.; Kuzikov, M. Development of a focused library of triazole-linked privileged-structure-based conjugates leading to the discovery of novel phenotypic hits against protozoan parasitic infections. *ChemMedChem*. **2018**, *13* (7), 678–683. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700786>.
- (15) Tron, G. C.; Pirali, T.; Billington, R. A.; Canonico, P. L.; Sorba, G.; Genazzani, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **2008**, *28* (2), 278–308. <https://doi.org/10.1002/med.20107>.
- (16) Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles as pharmacophores. *Chem. - An Asian J.* **2011**, *6* (10), 2696–2718. <https://doi.org/10.1002/asia.201100432>.
- (17) Leyva, E.; Leyva, S.; Moctezuma, E.; González-Balderas, R. M.; De Loera, D. Microwave-assisted synthesis of substituted fluorophenyl mono- and diazides by SNAr. A fast methodology to prepare photoaffinity labeling and crosslinking reagents. *J. Fluor. Chem.* **2013**, *156*, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2013.10.002>.
- (18) Grant, C. D.; Kang, S. O.; Hay, B. P. Synthesis of a hydrophilic naphthalimidedioxime. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (15), 7735–7740. <https://doi.org/10.1021/jo4009386>.
- (19) Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. 1,3-dipolare cycloadditionen, XXXII. Kinetik der additionen organischer azide an CC-mehrfachbindungen. *Chem. Ber.* **1967**, *100* (8), 2494–2507. <https://doi.org/10.1002/cber.19671000806>.
- (20) Huisgen, R. 1,3-Dipolar cycloaddition chemistry. *Wiley*. **1984**, 1–176.
- (21) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064. <https://doi.org/10.1021/jo011148j>.
- (22) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).
- (23) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999. <https://doi.org/10.1021/ja054114s>.
- (24) Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Said Stålsmeden, A.; Kann, N. Ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition reaction: Scope, mechanism, and applications. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (23), 14726–14768. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00466>.
- (25) Lone, S. H.; Bhat, K. A.; Majeed, R.; Hamid, A.; Khuroo, M. A. Click-chemistry inspired facile synthesis and bioevaluation of novel triazolyl analogs of Ludartin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (4), 1047–1051. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.018>.
- (26) Khan, S. S.; Hanelt, S.; Liebscher, J. Versatile synthesis of 1,2,3-triazolium-based ionic liquids. *Arch. Org. Chem.* **2009**, *2009* (12), 193–208. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0010.c17>.
- (27) M’Sahel, M.; Obadia, M. M.; Medimagh, R.; Serghei, A.; Said Zina, M.; Drockenmuller, E. Biosourced 1,2,3-triazolium ionic liquids derived from isosorbide. *New J. Chem.* **2016**, *40* (1), 740–747. <https://doi.org/10.1039/c5nj02660a>.

- (28) Khan, S. S.; Shah, J.; Liebscher, J. Synthesis of new ionic-liquid-tagged organocatalysts and their application in stereoselective direct aldol reactions. *Tetrahedron* **2010**, *66* (27–28), 5082–5088. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.04.115>.
- (29) Yan, F.; Lartey, M.; Jariwala, K.; Bowser, S.; Damodaran, K.; Albenze, E.; Luebke, D. R.; Nulwala, H. B.; Smit, B.; Haranczyk, M. Toward a materials genome approach for ionic liquids: Synthesis guided by *Ab Initio* property maps. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (47), 13609–13620. <https://doi.org/10.1021/jp506972w>.
- (30) Steiner, I.; Stojanovic, N.; Bolje, A.; Brozovic, A.; Polancec, D.; Ambriovic-Ristov, A.; Stojkovic, M. R.; Piantanida, I.; Eljuga, D.; Kosmrlj, J.; et al. Discovery of ‘click’ 1,2,3-triazolium salts as potential anticancer drugs. *Radiol. Oncol.* **2016**, *50* (3), 280–288. <https://doi.org/10.1515/raon-2016-0027>.
- (31) Shrestha, J. P.; Chang, C.-W. T. Safe and easy route for the synthesis of 1,3-dimethyl-1,2,3-triazolium salt and investigation of its anticancer activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (21), 5909–5911. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.078>.
- (32) Martín-Montes, Á.; Ballesteros-Garrido, R.; Martín-Escolano, R.; Marín, C.; Guitiérrez-Sánchez, R.; Abarca, B.; Ballesteros, R.; Sanchez-Moreno, M. Synthesis and *in vitro* leishmanicidal activity of novel [1,2,3]triazolo[1,5-*a*]pyridine salts. *RSC Adv.* **2017**, *7* (26), 15715–15726. <https://doi.org/10.1039/C7RA01070B>.
- (33) Wamhoff, H. 1,2,3-triazoles and their benzo derivatives. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Elsevier, **1984**; 669–732. <https://doi.org/10.1016/B978-008096519-2.00079-5>.
- (34) Zapata, F.; Gonzalez, L.; Caballero, A.; Alkorta, I.; Elguero, J.; Molina, P. Dual role of the 1,2,3-triazolium ring as a hydrogen-bond donor and anion- π receptor in anion-recognition processes. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21* (27), 9797–9808. <https://doi.org/10.1002/chem.201500231>.
- (35) Monasterio, Z.; Sagartzazu-Aizpurua, M.; Miranda, J. I.; Reyes, Y.; Aizpurua, J. M. Cationic 1,2,3-triazolium alkynes: Components to enhance 1,4-regioselective azide-alkyne cycloaddition reactions. *Org. Lett.* **2016**, *18* (4), 788–791. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00055>.
- (36) Edwards, M. P.; Price, D. A. Role of physicochemical properties and ligand lipophilicity efficiency in addressing drug safety risks. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2010**, *45*, 380–391. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(10\)45023-X](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(10)45023-X).
- (37) Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (9), 1102–1114. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.001>.
- (38) Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13* (2), 105–121. <https://doi.org/10.1038/nrd4163>.
- (39) Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand efficiency: A useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **2004**, *9* (10), 430–431. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03069-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03069-7).
- (40) Hopkins, A. L.; Keserü, G. M.; Leeson, P. D.; Rees, D. C.; Reynolds, C. H. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13* (2), 105–121. doi:10.1038/nrd4163.

- (41) Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Reich, J. R.; Rufener, C. OSIRIS, an entirely in-house developed drug discovery informatics system. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (2), 232–246. <https://doi.org/10.1021/ci800305f>.
- (42) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23* (1–3), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1).
- (43) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>.
- (44) Ritchie, T. J.; Macdonald, S. J. F. The impact of aromatic ring count on compound developability – Are too many aromatic rings a liability in drug design? *Drug Discov. Today*. **2009**, *14* (21–22), 1011–1020. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.014>.
- (45) Lovering, F.; Bikker, J.; Humblet, C. Escape from flatland: Increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (21), 6752–6756. <https://doi.org/10.1021/jm901241e>.
- (46) Shultz, M. D. Two decades under the influence of the rule of five and the changing properties of approved oral drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (4), 1701–1714. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00686>.
- (47) Leeson, P. D.; Springthorpe, B. The influence of druglike concepts on decision-making in Medicinal Chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (11), 881–890. <https://doi.org/10.1038/nrd2445>.
- (48) Zhang, M.-Q.; Wilkinson, B. Drug discovery beyond the ‘rule-of-five.’ *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18* (6), 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.005>.
- (49) Rudin, C. M.; Hann, C. L.; Garon, E. B.; Ribeiro de Oliveira, M.; Bonomi, P. D.; Camidge, D. R.; Chu, Q.; Giaccone, G.; Khaira, D.; Ramalingam, S. S.; Phase II study of single-agent Navitoclax (ABT-263) and biomarker correlates in patients with relapsed small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18* (11), 3163–3169. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3090>.
- (50) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or Medicinal Chemistry libraries for drug discovery. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1* (1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>.
- (51) Azzarito, V.; Long, K.; Murphy, N. S.; Wilson, A. J. Inhibition of α -helix-mediated protein–protein interactions using designed molecules. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (3), 161–173. <https://doi.org/10.1038/nchem.1568>.
- (52) Sheng, C.; Dong, G.; Miao, Z.; Zhang, W.; Wang, W. State-of-the-art strategies for targeting protein-protein interactions by small-molecule inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (22), 8238–8259. <https://doi.org/10.1039/c5cs00252d>.
- (53) Schieber, M.; Chandel, N. S. ROS Function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24* (10), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.
- (54) Roma, E. H.; Macedo, J. P.; Goes, G. R.; Gonçalves, J. L.; Castro, W. de; Cisalpino, D.; Vieira, L. Q. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasit. Vectors.* **2016**, *9* (1), 193. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1472-y>.
- (55) Carvalho, L.; Luque-Ortega, J. R.; López-Martín, C.; Castanys, S.; Rivas, L.; Gamarro, F.

- The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55 (9), 4204–4210. <https://doi.org/10.1128/AAC.00520-11>.
- (56) Krauth-Siegel, R. L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2008**, 1780 (11), 1236–1248. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>.
- (57) Vázquez, C.; Mejia-Tlachi, M.; González-Chávez, Z.; Silva, A.; Rodríguez-Zavala, J. S.; Moreno-Sánchez, R.; Saavedra, E. Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* **2017**, 591 (23), 3881–3894. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12904>.
- (58) Camarasa, M.J.; Velázquez, S.; Revuelto, A.; Gago, F.; Jimenez-Ruiz, A.; Toro, M.A.; Sánchez-Murcia, P.A.; de Lucio, H. Triazole-phenyl-thiazole heterocycles as innovative inhibitors of trypanothione reductase and their use as leishmanicides. *PCT/EP2018/086174*, **2018**.
- (59) Savjani, K. T.; Gajjar, A. K.; Savjani, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* **2012**, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>.
- (60) Wu, D.; Sedgwick, A. C.; Gunnlaugsson, T.; Akkaya, E. U.; Yoon, J.; James, T. D. Fluorescent chemosensors: The past, present and future. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (23), 7105–7123. <https://doi.org/10.1039/C7CS00240H>.
- (61) Fu, Y.; Finney, N. S. Small-molecule fluorescent probes and their design. *RSC Adv.* **2018**, 8 (51), 29051–29061. <https://doi.org/10.1039/C8RA02297F>.
- (62) Cummings, C. G.; Hamilton, A. D. Expedient route to functionalized a water soluble 5-6-5 imidazole-phenyl-thiazole based α -helix mimetics. *Tetrahedron* **2013**, 69 (5), 1663–1668. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.070>.
- (63) Smallwood, I. M. Handbook of organic solvent properties. Elsevier. **1996**.
- (64) de Lucio, H. Inhibición de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* mediada por peptidomiméticos de la hélice α 2 de la interfaz de dimerización, 2018. Universidad de Alcalá.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3: MECANISMO DE INHIBICIÓN DE *Li-TryR* Y ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS COMPUESTOS CON LA ENZIMA

En este **Capítulo 3** se aborda el estudio del mecanismo de inactivación de la *Li-TryR* por parte de los inhibidores más representativos de triazol y sales de triazolio de las **Series I y II** del **Capítulo 2**, así como el estudio de su modo de unión a la enzima, con el fin de proponer un modelo de interacción que pueda explicar las relaciones estructura-actividad biológica obtenidas y que sirva de punto de partida para el diseño racional de nuevos ligandos.

Para la caracterización de la inhibición se utilizarán herramientas de cinética enzimática en colaboración con el grupo del Prof. Antonio Jiménez (UAH). Para el estudio de la interacción de los ligandos con la enzima se utilizarán tanto técnicas de cristalografía de rayos X en colaboración con el grupo del Prof. Juan Hermoso del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR-CSIC), como herramientas computacionales en colaboración con el Prof. Federico Gago (UAH) y con el Dr. Pedro A. Sánchez Murcia de la Universidad de Viena.

3.1. Mecanismo de inhibición de *Li-TryR* por parte de los compuestos

En trabajos anteriores a esta Tesis Doctoral,¹ se demostró que el péptido prototipo **P1** inactivaba la enzima siguiendo un modelo de inhibición lenta (tiempo-dependiente) comportándose como un inhibidor no competitivo, con un valor de la constante α igual a 1 (α hace referencia al efecto del inhibidor/sustrato en la afinidad de la enzima, y tiende a infinito en inhibidores competitivos clásicos). No obstante, este concepto de α se explicará con mayor detalle en el siguiente apartado. Asimismo, se determinó un valor de la constante de inhibición (K_i) para el péptido **P1** de 0.5 μM que indicaba una alta afinidad por la enzima, muy superior a la descrita, por ejemplo, para el inhibidor mepacrina de referencia ($K_i = 19 \mu\text{M}$).²

Por otro lado, se determinó que el péptido inactivaba la TryR de manera irreversible ya que inducía la precipitación de la enzima tras desdimerizarla. Así, el péptido prototipo **P1** representó un ejemplo especialmente novedoso de inhibidor irreversible no covalente de este tipo de enzimas.

En esta Tesis Doctoral, nos planteamos estudiar el mecanismo de inhibición de los compuestos más representativos comentados en el **Capítulo 2** siguiendo una metodología similar a la utilizada para el péptido prototipo. Para ello, el primer paso consistió en establecer el tipo de mecanismo de inactivación de la enzima (reversible o irreversible) por parte de los compuestos, para poder determinar a continuación una K_i fiable mediante el ajuste adecuado de los datos experimentales a los modelos teóricos de cada tipo de inhibidor.

• Ensayos de reversibilidad

La reversibilidad de una inhibición se puede determinar analizando la recuperación de la actividad enzimática tras una dilución rápida del medio de reacción, pre-incubado con la enzima y el inhibidor.

Así, se realizaron estudios de reversibilidad mediante pre-incubación de la *Li-TryR* con los compuestos de la **Serie I (2.26 - 2.28 y 2.54)** y con los compuestos de la **Serie II (2.80 y 2.81)**, durante 16 horas simulando condiciones del ensayo de actividad en presencia de DTNB (oxidante final), FAD, NADPH/NADP⁺ y sustrato natural tripanotión. Tras la incubación en las condiciones anteriores se llevó a cabo una dilución rápida (x57), y se midió posteriormente la actividad residual de *Li-TryR* en el sobrenadante. Los resultados se recogen en la **Figura 3.1** donde se usaron como controles negativos la mepacrina y la reacción en ausencia de inhibidor (DMSO), y como control positivo el péptido **P1**. Con el fin de correlacionar los resultados en este ensayo con la capacidad desdimerizadora de los compuestos señalados, se incluyen en la **Figura 3.1** los valores de $CI_{50 \text{ dim}}$ de los mismos en el ensayo de dimerización.

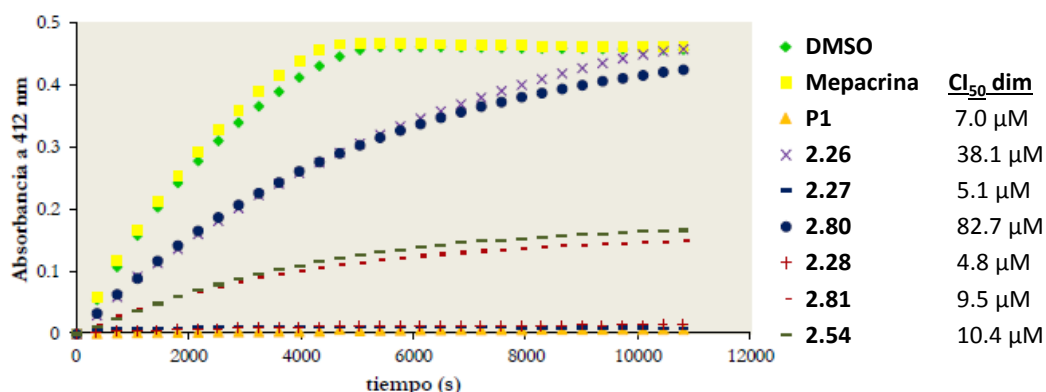


Figura 3.1. Actividad residual de *Li-TryR* en el sobrenadante diluido tras incubación de la enzima (7 nM) durante 16 horas con el ligando (1.3 μM).

Como puede observarse, un inhibidor reversible clásico como la mepacrina permite la recuperación completa de la actividad catalítica tras la dilución, al igual que el control de DMSO. Por el contrario, en los disruptores de dimerización más potentes **2.27** y **2.28** ($CI_{50 \text{ dim}} \approx 5 \mu\text{M}$) se observó una inactivación total de la enzima que no pudo ser revertida tras la dilución, al igual que sucedía con el péptido prototipo **P1**. Los inhibidores de dimerización **2.54** y **2.81** ($CI_{50 \text{ dim}} \approx 10 \mu\text{M}$) presentaron, en cambio, una actividad residual de *Li-TryR* cercana al 25%, mientras que las muestras incubadas con los inhibidores de dimerización menos potentes **2.26** ($CI_{50 \text{ dim}} = 38.1 \mu\text{M}$) y **2.80** ($CI_{50 \text{ dim}} = 82.7 \mu\text{M}$), presentaron una actividad enzimática residual próxima al 75%. A la vista de estos resultados se puede deducir que existe una correlación directa entre la disminución de la actividad residual de la enzima y los valores de $CI_{50 \text{ dim}}$, y por consiguiente, estos resultados indican la capacidad de nuestros compuestos para inhibir la enzima de manera irreversible.

- **Ensayos de precipitación de la enzima en presencia de los inhibidores**

A continuación y de manera similar a los estudios realizados previamente con el péptido prototipo, nos planteamos estudiar si la inactivación irreversible de la enzima observada anteriormente en presencia de los compuestos, era debida a la precipitación de la enzima. Para ello, se incubó la enzima (7 nM) con los compuestos anteriores (25 μ M) durante 16 horas observándose la formación de un precipitado. A continuación, se centrifugaron las muestras y se analizaron los sobrenadantes mediante *western blot* para comprobar la presencia o ausencia de la enzima.

En primer lugar se llevó a cabo el análisis de las muestras incubadas en ausencia de reacción catalítica, utilizando nuevamente los mismos controles que en el experimento anterior. Los resultados se muestran a continuación en la **Figura 3.2**.

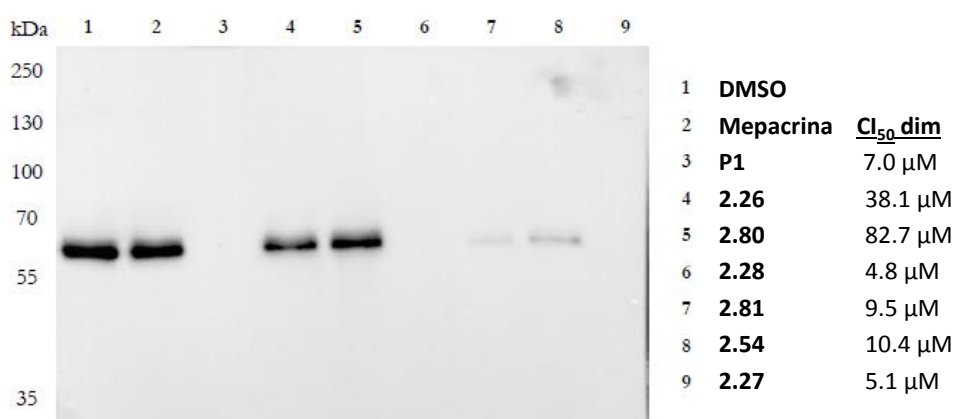


Figura 3.2. Ensayo de precipitación de *Li-TryR* (7 nM) tras la incubación de los inhibidores (25 μ M) con la enzima durante 16 horas en ausencia de reacción catalítica.

Como puede observarse en la figura, la intensidad de las bandas observadas correlacionaba con la potencia desdimerizadora (CI_{50} dim) de los compuestos. Así, los disruptores de dimerización más potentes **2.27**, **2.28**, **2.54** y **2.81** (CI_{50} dim 5 - 10 μ M) no presentaron la banda correspondiente a la proteína en el *western blot* al igual que el péptido **P1**, lo que indicó la precipitación de la enzima. En cambio, para los inhibidores moderados de dimerización **2.26** y **2.80** (CI_{50} dim > 25 μ M) sí se observó la presencia de una cierta cantidad de proteína en el sobrenadante. Por último, en los experimentos control con DMSO y con el inhibidor reversible mepacrina, se observó de manera muy nítida la presencia de proteína en el sobrenadante, descartándose así la precipitación de la enzima en ambos casos.

Estos datos confirmaron que la inactivación irreversible de la *Li-TryR* era debida a la desnaturalización de la enzima, observándose una correlación muy clara entre el efecto desdimerizador de los compuestos y la precipitación de la misma.

Como se ha puntualizado anteriormente, estos experimentos de precipitación se habían realizado en ausencia de reacción catalítica, por lo que a continuación se decidió llevar a cabo estos mismos ensayos bajo las condiciones de reacción empleadas en el ensayo de actividad oxidorreductasa en presencia del sustrato y de los cofactores de la enzima (**Figura 3.3**).

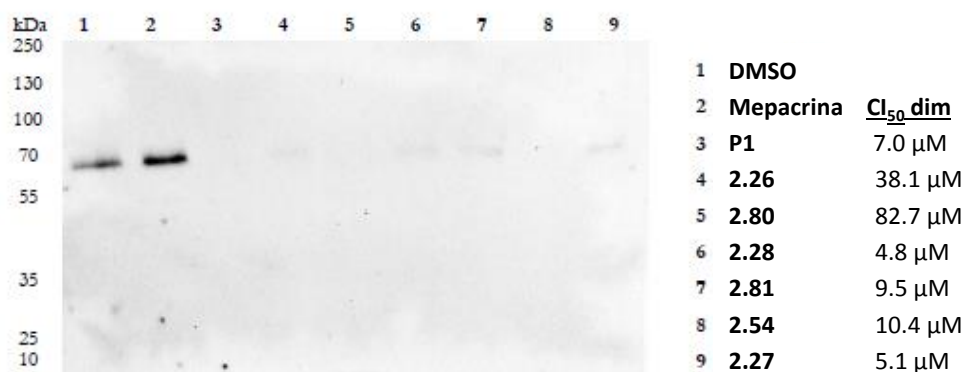


Figura 3.3. Ensayo de precipitación de *Li-TryR* (7 nM) tras la incubación de los inhibidores (25 μM) con la enzima durante 16 horas en presencia de reacción catalítica.

El análisis de *western blot* de los sobrenadantes condujo, en todos los casos, a la precipitación de la proteína tanto para los inhibidores de la **Serie I** como para los de la **Serie II** ensayados. Estos resultados parecen indicar que el mecanismo de inhibición irreversible de nuestros compuestos, y por consiguiente la precipitación de la enzima, es común para todos ellos y se potencia cuando la enzima está en funcionamiento.

- **Determinación de las constantes de inhibición (K_i) de las sales de triazolio 2.80 y 2.81**

Una vez demostrado el carácter irreversible de este tipo de inhibidores, nos centramos a continuación, al igual que con el péptido **P1**, en el cálculo de la K_i de las sales de triazolio **2.80** y **2.81** de la **Serie II**, por tratarse de los inhibidores más potentes y con mayor solubilidad.

De este modo, tras el ajuste de las distintas curvas de progreso de reacción de los compuestos **2.80** y **2.81** a los modelos teóricos,³ se observó que sus perfiles cinéticos correspondían a los de un inhibidor irreversible de unión lenta (tiempo-dependiente) mostrado en la **Figura 3.4**.

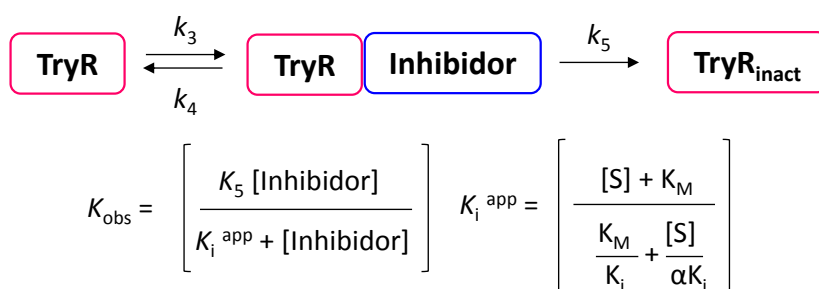


Figura 3.4. Modelo de inactivación de TryR propuesto para los compuestos y ecuaciones cinéticas para el cálculo de la K_i de un inhibidor irreversible tiempo-dependiente.

Este mecanismo de inhibición consta de dos pasos secuenciales, uno de unión a la enzima y un segundo proceso de inactivación. En la figura anterior se indican las ecuaciones que rigen este proceso y que se emplean para determinar tanto la constante K_{obs} (variación en la velocidad de reacción a lo largo del tiempo) a distintas concentraciones de compuesto, como la constante aparente de inhibición (K_i^{app}) a una determinada concentración de inhibidor. La K_i^{app} puede relacionarse a su vez con la constante de inhibición real K_i mediante el coeficiente de ajuste α , en función del comportamiento competitivo o no del inhibidor. Como se ha comentado anteriormente en la descripción del comportamiento cinético del péptido **P1**, para un inhibidor no competitivo α es igual a 1 y por tanto la K_i^{app} es igual que la K_i .

Aplicando las ecuaciones tal y como se describe en detalle en la Tesis Doctoral de Héctor de Lucio,³ se determinaron las constantes de inhibición K_i de los compuestos **2.80** y **2.81** que resultaron ser de 0.5 y 1.8 μM respectivamente, similares a las del péptido prototipo **P1** ($K_i = 0.5 \mu\text{M}$) y aproximadamente 20 veces inferior a la de la mepacrina ($K_i = 19 \mu\text{M}$).

No obstante y a diferencia de lo que ocurría con el péptido prototipo **P1**, los compuestos **2.80** y **2.81** presentaron un cierto carácter competitivo ya que los valores de K_i^{app} aumentaban al incrementar la concentración de sustrato. En este caso se observaron valores de $\alpha \gg 1$ a diferencia del valor de $\alpha = 1$ determinado para el péptido **P1**.

Estos resultados sugirieron un sitio de interacción diferente con la enzima para el péptido de referencia y para las sales de triazolio analizadas.

Con el fin de determinar el modo de unión de estos compuestos con la enzima, nos planteamos a continuación llevar a cabo estudios de cristalografía de R-X para intentar obtener estructuras cristalinas de complejos de *Li-TryR* con los inhibidores más representativos de ambas series.

3.2. Estudio de los complejos cristalográficos de los compuestos con *Li-TryR* mediante difracción de rayos X

En primer lugar se intentó la cocrystalización de la *Li-TryR* con los disruptores de dimerización de la **Serie I** (**2.27**, **2.28** y **2.54**) y de la **Serie II** (**2.81**). En todos los casos resultó imposible la cristalización de la enzima ya que se produjo la precipitación de la misma en presencia de los disruptores.

A la vista de estos problemas, se decidió emplear la técnica de *soaking* que consiste en la preformación del cristal de *Li-TryR* siguiendo las condiciones de cristalización descritas por Baiocco y colaboradores⁴, seguido de la puesta en contacto de ese mismo cristal con una disolución del ligando durante diferentes tiempos de incubación. Sin embargo, mediante esta técnica tampoco se pudo obtener ningún complejo enzima/ligando dado que en presencia de la disolución de inhibidor se producía la fractura del cristal y posterior precipitación.

Ante la imposibilidad de cristalizar los disruptores de dimerización en complejo con la *Li*-TryR, decidimos intentar la cristalización de la sal de triazolio **2.79** (**Figura 3.3A**) que no había mostrado actividad en el ensayo de dimerización, por lo que podría resultar una herramienta útil para los estudios cristalográficos.

Los intentos iniciales de cocrystalización llevados a cabo incubando la *Li*-TryR en presencia de **2.79** a una concentración de 5 mM *overnight* bajo diferentes condiciones de cristalización, dio lugar nuevamente, en todos los casos, a la precipitación de la enzima. Sin embargo, el empleo de técnicas de *soaking* durante 30 - 50 minutos utilizando una disolución 1 mM de **2.79**, sí permitió obtener cristales del complejo **2.79**- *Li*-TryR que difractaban a 2.4 Å.

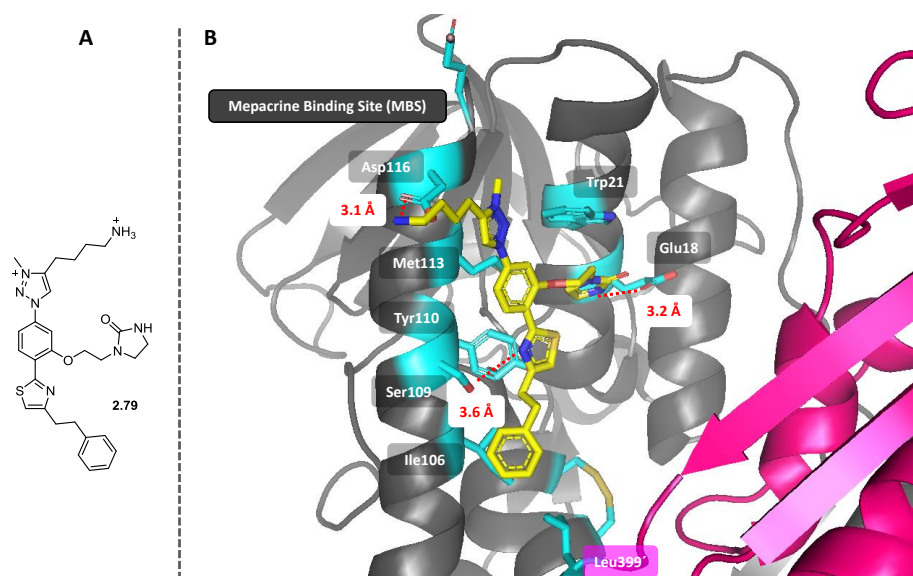


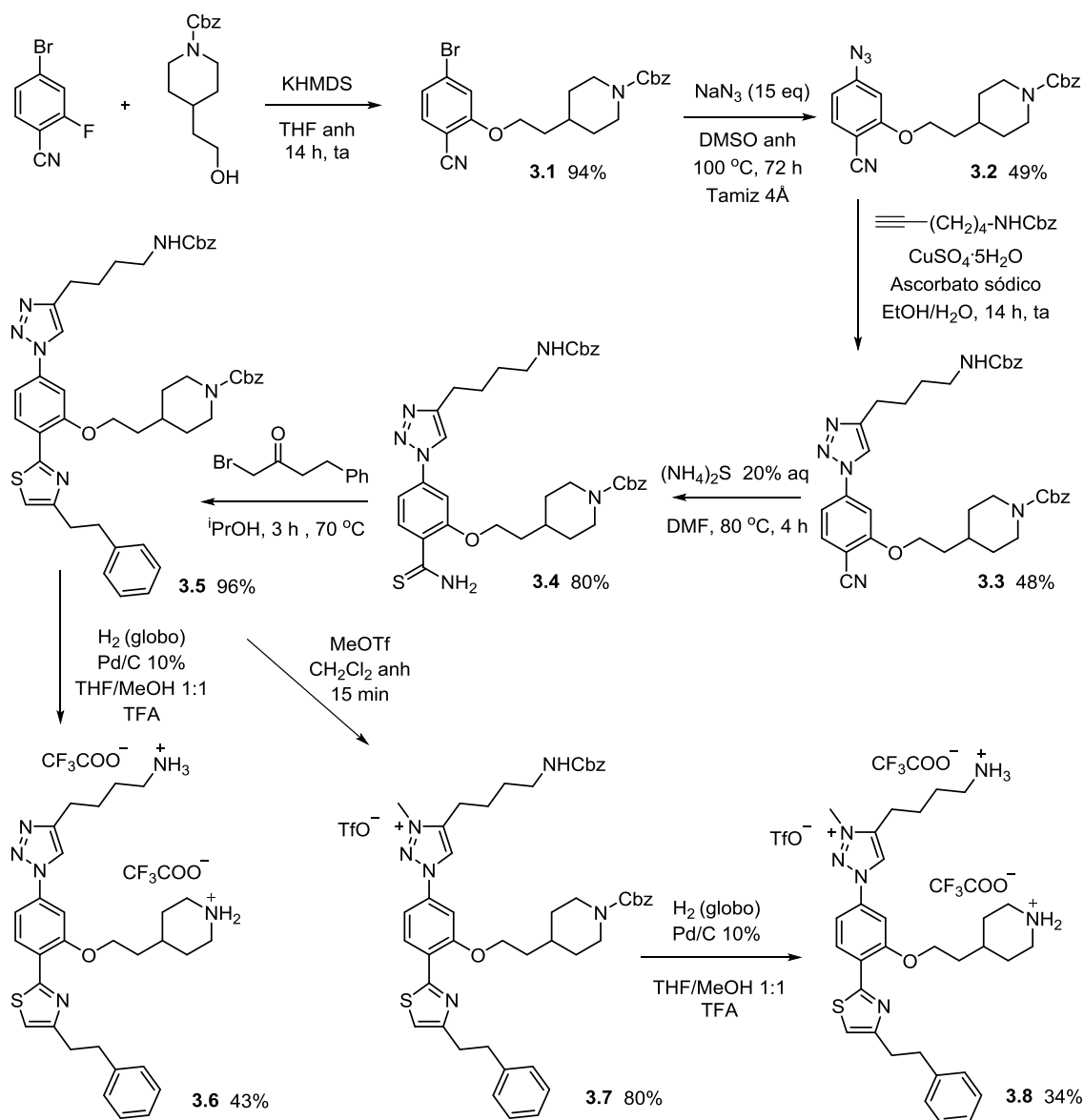
Figura 3.3. A) Estructura de **2.79**; **B)** Estructura cristalina del complejo **2.79** - *Li*-TryR obtenida mediante *soaking*. En azul se resaltan los residuos de la enzima implicados en la interacción con el compuesto.

La estructura cristalina de dicho complejo (**Figura 3.3B**), confirmó la presencia del ligando en el centro activo de la enzima cerca del sitio de unión del sustrato, en concreto interaccionando en el sitio de unión de mepacrina (*Mepacrine Binding Site*, MBS).

Como puede observarse, el grupo amonio terminal del sustituyente **R₁** podría establecer una interacción electrostática (puente salino) con el residuo de Asp116. Por otro lado, la imidazolidinona (**R₂**) se dispuso apilada hacia el residuo de Trp21 de manera que su grupo -NH queda a distancia de enlace de hidrógeno (3.2 Å) con la cadena lateral del residuo de Glu18. El átomo de N del anillo de tiazol podría establecer también un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la Ser109. Finalmente, el grupo fenilo de **R₃** se situó en un entorno hidrófobo constituido por las cadenas laterales de los residuos alifáticos de Ile106 y de Leu399', este último perteneciente al sitio Z del otro monómero de la enzima. Cabe mencionar, además, que bajo estas condiciones de cristalización las cisteínas catalíticamente activas se encontraron en su forma oxidada.

La interacción de esta sal de triazolio **2.79** en el sitio de unión del sustrato (centro activo), podría explicar tanto la ausencia de capacidad disruptora de la dimerización de este compuesto ($Cl_{50\text{ dim}} > 200\text{ }\mu\text{M}$), como el carácter competitivo observado para las sales de la **Serie II** análogos **2.80** y **2.81** en los estudios cinéticos anteriores.

A la vista de estos resultados cristalográficos, decidimos llevar a cabo, a continuación, modificaciones estructurales en el ligando en base a los datos de rayos X con el fin de optimizar las interacciones en el centro activo y obtener así compuestos con mayor afinidad. Así, nos planteamos la síntesis del compuesto **3.8** (**Esquema 3.1**) en el que se reemplazaría el anillo de imidazolidinona de **R₂** de **2.79**, por un anillo de piperidina cargado positivamente para explorar una posible interacción electrostática con el Glu18 en lugar del enlace de hidrógeno observado en la sal cristalizada anteriormente.

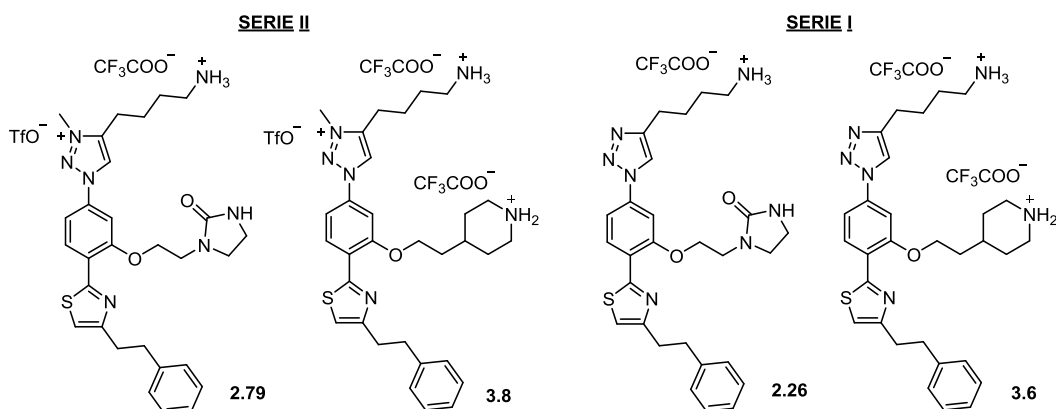


Esquema 3.1. Síntesis de los derivados de piperidina **3.6** y **3.8**.

La preparación de **3.8** se realizó siguiendo una ruta sintética similar a la descrita en el **Capítulo 2** que se refleja en el esquema anterior. Los pasos clave de SN_{Ar} a partir del 4-bromo-2-fluorobenzonitrilo y la piperidina protegida adecuadamente, seguido de cicloadición 1,3-dipolar a partir de la azida intermedia **3.2** y síntesis de Hantzsch empleando la tioamida sintetizada **3.4**, condujeron, con buenos rendimientos, al compuesto de triazol protegido **3.5**. Finalmente la alquilación del triazol y posterior hidrogenólisis permitió acceder al compuesto objetivo **3.8** de la **Serie II**. Con fines comparativos, se llevó a cabo la desprotección directa de **3.5** para acceder al derivado de triazol **3.6** de la **Serie I**.

Una vez obtenidos los derivados de piperidina **3.6** y **3.8** de ambas series, se llevó a cabo su evaluación biológica en ensayos enzimáticos de actividad y de dimerización frente a *Li*-TryR. Los resultados se muestran en la **Tabla 3.1** donde se comparan sus valores de CI_{50} con los de la sal de triazolio de referencia **2.79** y con el inhibidor competitivo mepacrina. Asimismo, se incluye el compuesto de triazol **2.26** de la **Serie I** con fines comparativos.

Tabla 3.1. Evaluación biológica de los nuevos derivados de piperidina **3.6** y **3.8**, los análogos de imidazolidinona **2.26** y **2.79** y la mepacrina como control. Se recogen los valores de $CI_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).



Serie	Compuesto	$CI_{50}^{act} (\mu M)^a$	$CI_{50}^{dim} (\mu M)^a$
/	Mepacrina	12.9 ± 0.5	/
I	2.26	14.6 ± 1.0	38.1 ± 1.2
II	2.79	12.9 ± 1.0	> 200
I	3.6	5.8 ± 0.9	> 200
II	3.8	3.4 ± 0.3	> 200

^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la actividad enzimática o la formación del dímero.

La introducción del anillo de piperidina en **R₂** trajo consigo una mejora de entre 3 y 4 veces en la inhibición de la actividad oxidorreductasa de los derivados **3.6** y **3.8** con respecto a los compuestos de imidazolidinona **2.26** y **2.79**, lo que apoyaba la hipótesis de diseño. Por otro lado, ambos compuestos resultaron inactivos en el ensayo de dimerización al igual que **2.79**, lo

cual está en consonancia con la tendencia observada, hasta el momento, de que un aumento de la carga formal positiva favorece la inhibición de la actividad en detrimento de la capacidad desdimerizadora.

La ausencia de capacidad disruptora de la dimerización de los nuevos compuestos, nos permitió realizar su cocrystalización con la enzima siguiendo procedimientos de *soaking* análogos a los empleados con el compuesto **2.79**.

El análisis de los cristales obtenidos mediante difracción de R-X (**Figura 3.4**) reveló nuevamente la presencia de los ligandos en el centro activo de la enzima, en el MBS. No obstante, se observaron algunas diferencias significativas en el modo de unión de ambos ligandos.

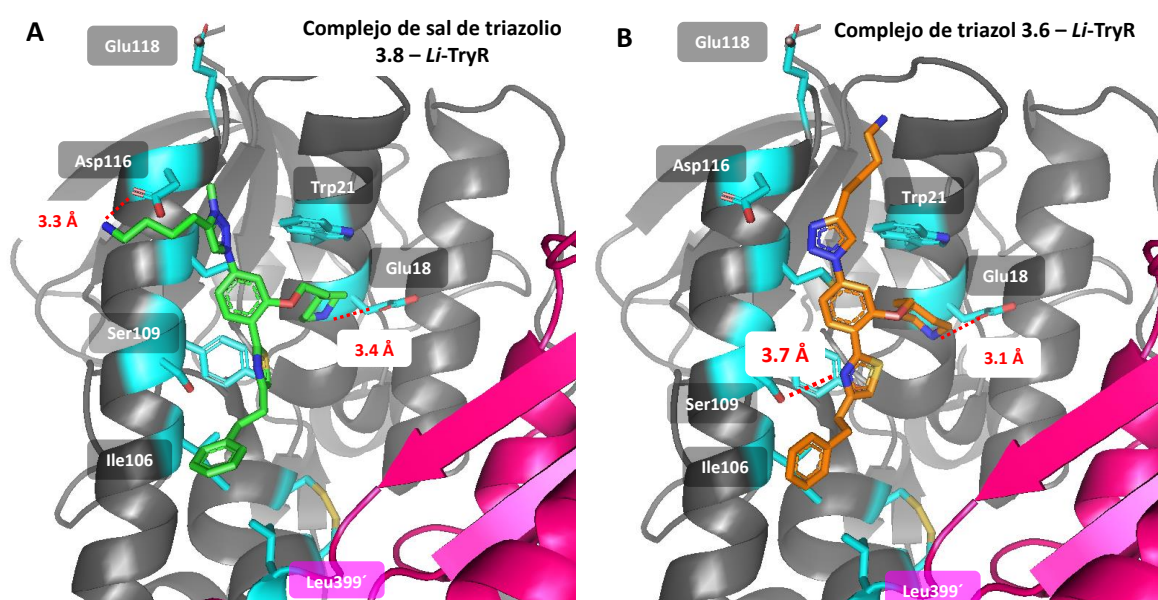


Figura 3.4. Estructura cristalina de los complejos: A) **3.8** (verde); B) **3.6** (naranja) con *Li-TryR*.

En cuanto a la estructura del complejo de la sal de triazol **3.8** (**Figura 3.4A**), se pudo observar como el ligando se dispuso de manera similar al prototipo **2.79** de forma que el grupo butilamina de **R₁** establecería un puente salino con el residuo Asp116, mientras que el grupo fenilo de **R₃** se albergaría en un bolsillo hidrófobo definido por los residuos Ile106 y Leu399'. Por otro lado, el nuevo anillo de piperidina de **R₂** se situó a una distancia y en una orientación adecuada para establecer un puente salino con el Glu18, tal y como estaba propuesto en el diseño de este nuevo ligando. Esta nueva interacción permitiría explicar la mejora en 4 veces de la actividad del compuesto **3.8** con respecto a **2.79**.

El análisis de la estructura del complejo de triazol **3.6** - *Li-TryR* (**Figura 3.4B**), mostró diferencias sustanciales en la disposición del anillo de triazol con respecto a las sales de triazol, de tal manera que el sustituyente **R₁** no se orienta hacia el Asp116 como ocurría en las estructuras anteriores, sino que se dispondría hacia el Glu118. No obstante, es necesario

remarcar que la escasa densidad electrónica encontrada para esta cadena alifática podría indicar una gran movilidad de la misma, no observándose ninguna interacción preferente para el grupo amino de **R₁**. Este resultado podría estar relacionado con la mayor movilidad del anillo de triazol no cargado de **3.6** con respecto a la sal de triazolio **3.8**, debido a su vez al impedimento estérico que podría ejercer el grupo metilo de las sales de triazolio que limitaría la rotación del heterociclo.

El resto de interacciones con la Ser109 y con el bolsillo hidrófobo de Ile106 - Leu399' fueron similares a las observadas en el cristal de **2.79**.

En la **Figura 3.5** se muestran las estructuras superpuestas de los tres ligandos cristalizados, donde se aprecian con claridad las diferencias fundamentales en la disposición del anillo de triazol y en la cadena de butilamina (**R₁**), así como las similitudes en la localización y orientación de sustituyentes **R₂** y **R₃**.

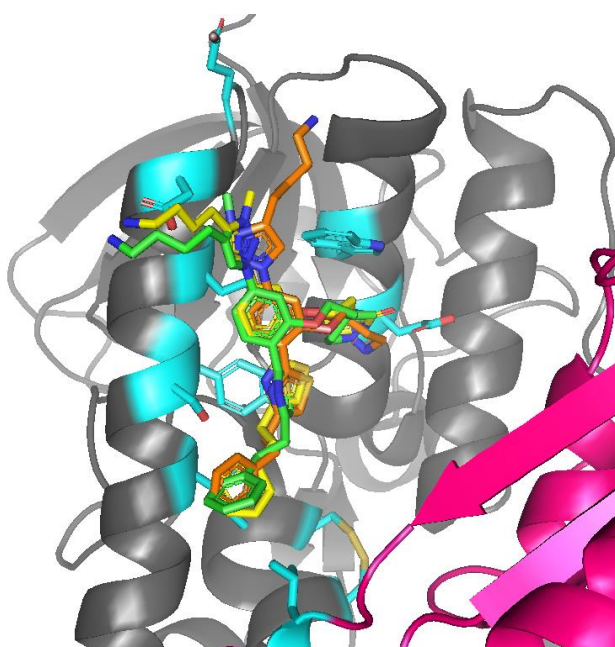


Figura 3.5. Comparativa de la disposición de los ligandos **2.79** (amarillo), **3.6** (naranja) y **3.8** (verde) en la estructura cristalina de los complejos con *Li-TryR*.

Cabe resaltar por último que en las estructuras cristalinas de estos nuevos complejos, las cisteínas del sitio catalítico Cys52 y Cys57 también se encuentran en su forma oxidada formando un puente disulfuro, al igual que con **2.79**.

Hasta ahora todos los ligandos que se han podido cristalizar con la enzima han sido aquellos que no presentaban un efecto de desestabilización del homodímero. Por tanto, si bien la inhibición de la actividad oxidorreductasa observada para estos compuestos podría relacionarse con la interacción en el centro activo, el efecto desdimerizador potente mostrado por lo general por los triazoles de la **Serie I**, no parece sencillo de explicarse a través de una hipótesis de interacción a nivel de centro activo. Por este motivo, con el fin de proponer un modelo de interacción para los disruptores de dimerización en la interfaz de dimerización, se

decidió abordar el estudio de su modo de unión mediante herramientas computacionales ante la imposibilidad de emplear técnicas de R-X con estos compuestos.

3.3. Estudio de la interacción con *Li-TryR* de los disruptores de dimerización mediante herramientas computacionales

En primer lugar se llevaron a cabo estudios computacionales de *docking* de los desdimerizadores más potentes **2.27** y **2.28**, portadores de grupos poliaromáticos de naftilo y bifenilo en **R₃** (**Figura 3.6**), en la región de la interfaz de dimerización donde se sitúa la hélice α original que mimetizaban los péptidos y peptidomiméticos antecesores de este trabajo.

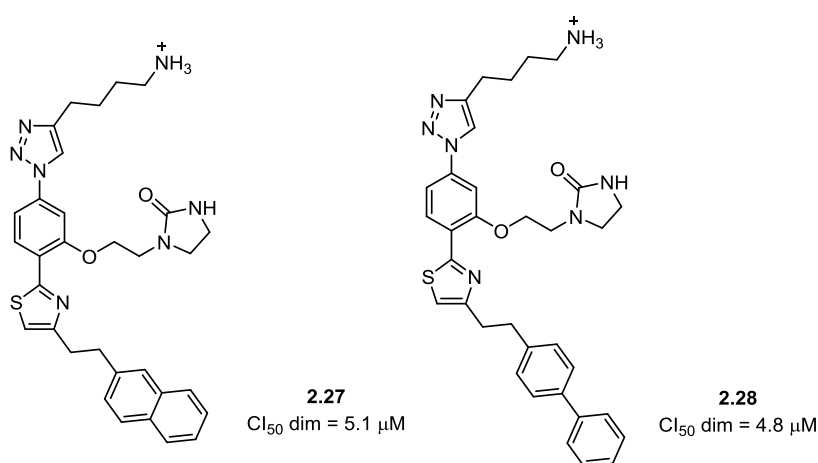


Figura 3.6. Disruptores de dimerización más potentes **2.27** y **2.28** (Serie I).

Sin embargo, ante la imposibilidad de encontrar un modelo de interacción de nuestros compuestos en esta región de la interfaz que permitiese alojar los grupos hidrófobos voluminosos de **R₃**, decidimos explorar otros posibles sitios de unión alternativos en la enzima para ligandos con estas características estructurales.

3.3.1. Búsqueda de posibles sitios de unión a *Li-TryR* mediante FTMap para los disruptores de dimerización

De cara al análisis e identificación de posibles regiones de la *Li-TryR* para la unión de moléculas pequeñas, decidimos emplear en primer lugar el servidor de *mapping* FTMap.⁵ Este servidor basa su funcionamiento en el muestreo de una superficie proteica determinada con moléculas de disolvente de diferentes tamaños, formas y polaridades, empleadas a modo de sonda. El algoritmo del programa realiza un *docking* en la superficie enzimática con cada tipo de sonda, y a continuación, las soluciones de menor energía son nuevamente minimizadas empleando paquetes de mecánica molecular. Los resultados se asocian en grupos o *clusters* en función de la coincidencia espacial y de orientación de las moléculas de disolvente. Finalmente, la presencia de múltiples *clusters* de baja energía en la misma región de la enzima,

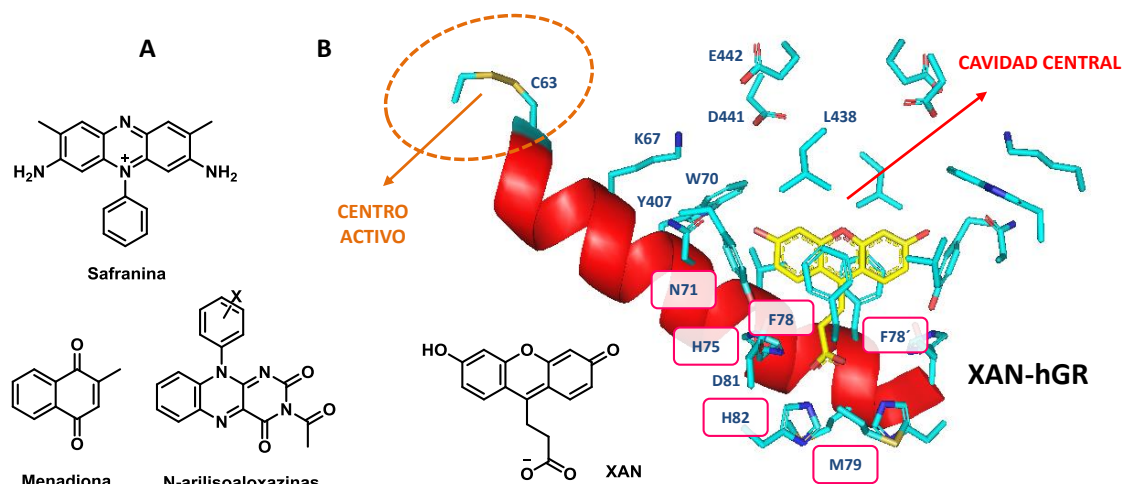


Figura 3.8. A) Estructura de los inhibidores safranina, menadiona, N-arilisoaloxazinas y el xanteno XAN, cristalizados en la cavidad central interfacial de hGR; **B)** Estructura cristalizada del complejo XAN-hGR.

Se ha intentado establecer una posible interrelación entre esta cavidad central de hGR y el centro activo de la enzima (situado a 20 Å de distancia) que pudiera explicar la inhibición observada para estos compuestos. Tomando como referencia la estructura cristalizada del ligando XAN (**Figura 3.8B**), una de las hipótesis consideradas se basa en el hecho de que los principales residuos implicados en la interacción con el ligando (N71, H75, F78, M79 y H82), se encuentran situados en la misma hélice α que contiene la cisteína catalíticamente activa C63 del centro activo. Por tanto, pequeños cambios conformacionales producidos como consecuencia de la unión de ligandos en esta cavidad, podrían trasladarse hasta el centro activo y afectar a la actividad catalítica de la enzima.⁹

Con estos antecedentes en hGR, nos planteamos estudiar si esta cavidad central interfacial de la *Li-TryR* podría ser un posible sitio de unión para nuestros disruptores de dimerización, lo cual representa a su vez una hipótesis novedosa e inexplorada hasta el momento en esta enzima.

Para ello, en primer lugar utilizamos el programa CAVER¹¹ para el análisis de los túneles proteicos que dan acceso a esta región enterrada en el dominio de dimerización de la enzima, y estudiar así la accesibilidad de los inhibidores hasta la misma.

3.3.2. Análisis de la accesibilidad a la cavidad central mediante CAVER

CAVER es un software que permite la identificación de manera rápida, precisa y automatizada de los caminos que conectan cavidades proteicas con el disolvente exterior. Estas trayectorias de acceso a huecos internos, se caracterizan en función de parámetros como el radio de Van der Waals de la parte más estrecha del túnel (anchura limitante o “cuello de botella”), la longitud total del túnel o incluso la curvatura del mismo (dificultad de acceso). Finalmente, los valores de estos parámetros se combinan para establecer la puntuación final de cada túnel como una medida clasificatoria de su accesibilidad.¹²

La aplicación del algoritmo de CAVER sobre la *Li-TryR* (PDB: 2JK6) dio como resultado la identificación de 20 túneles proteicos distintos, clasificados en función de la probabilidad de cada uno para representar una posible ruta de acceso a los bolsillos y huecos de la enzima. De esas 20 soluciones, las 8 con mejor puntuación del programa (**Figura 3.9**) resultaron ser precisamente las que conectan el exterior de la enzima con la cavidad central hidrófoba propuesta por FTMap. No obstante, dada la naturaleza homodimérica de la enzima, estos resultados se pudieron agrupar a su vez en 4 parejas de soluciones idénticas que se muestran en la **Figura 3.9**.

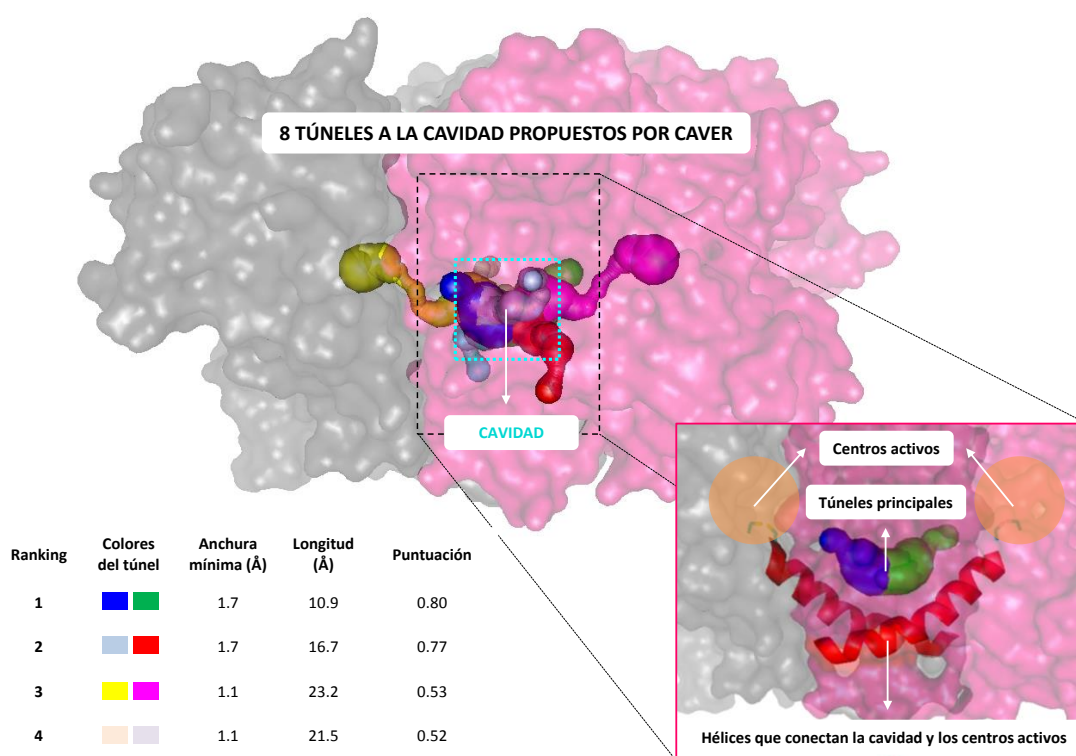


Figura 3.9. Túneles de acceso a la cavidad central de *Li-TryR* (2JK6) identificados por el programa CAVER.

Además, de esos 4 grupos o *clusters* con mejor puntuación, la primera pareja de túneles con mayor accesibilidad (**Figura 3.9 zoom**) son los que conectan los dos centros activos de la enzima con la cavidad central. Como veremos más adelante, la buena accesibilidad a la cavidad central desde el centro activo a través estos túneles nos llevó a plantear un posible modelo de interacción de nuestros compuestos en esta región interfacial.

3.3.3. Propuesta de un modelo de interacción de los disruptores de dimerización en la cavidad central interfacial

Una vez estudiada la accesibilidad a la cavidad central de *Li-TryR*, llevamos a cabo estudios de *docking* y dinámica molecular (DM) en esta región con los inhibidores de dimerización más potentes, portadores de sustituyentes aromáticos voluminosos en el anillo de tiazol. Estos estudios se realizaron empleando el programa AutoDock4.¹³

En primer lugar, se llevó a cabo el *docking* con los disruptores de dimerización monosustituidos en el tiazol **2.27** ($R_3 = -(\text{CH}_2)_2\text{-Naftil}$) y **2.28** ($R_3 = -(\text{CH}_2)_2\text{-Bifenil}$) en la cavidad hidrófoba de *Li-TryR*. Los mejores modos de unión o “poses” de estos compuestos se reflejan en la **Figura 3.10**.

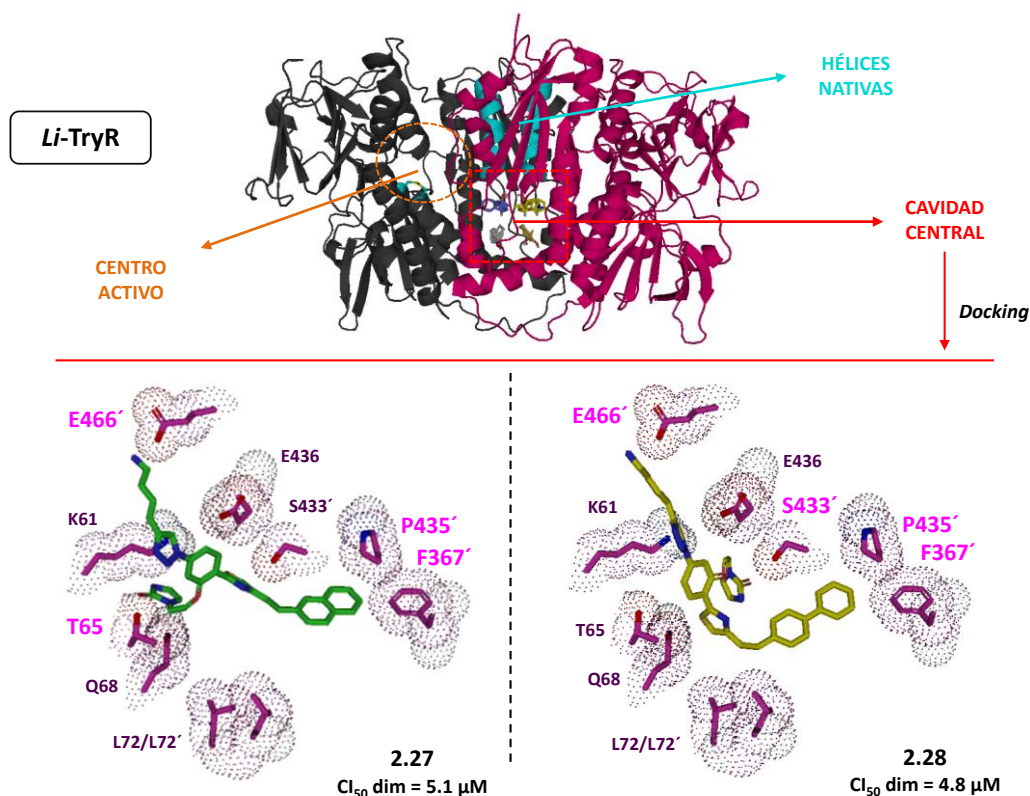


Figura 3.10. Estudios de *docking* en la cavidad central de *Li-TryR* (2JK6) con los inhibidores monosustituidos en el tiazol **2.27** y **2.28**.

Como puede observarse, los dos inhibidores se localizan de manera similar en el dominio interfacial, disponiendo el esqueleto central a lo largo del túnel mencionado anteriormente (que conecta esta región con el centro catalítico) de forma que el grupo amonio terminal (R_1) podría interactuar con el residuo cargado E466', mientras que los sustituyentes aromáticos voluminosos de naftilo y bifenilo (R_3) se alojarían en un bolsillo hidrófobo definido por los residuos P435' y F367' en la cavidad central, en una de las regiones previamente identificadas por el programa FTMap.

En cuanto al grupo imidazolidinona de R_2 , se observó que el grupo -NH se sitúa a una distancia y en una orientación adecuadas para la formación de un enlace de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos polares de T65 para **2.27**, o bien del residuo de S433' en el caso de **2.28**. No obstante, la falta de convergencia de los resultados de *docking* con respecto a la disposición espacial de R_2 parecen indicar que la imidazolidinona no tendría una interacción preferente con ningún residuo, lo que a la vista de los resultados está relacionado también con la libertad de giro del anillo central del esqueleto.

A continuación, se realizaron estudios de *docking* con el disruptor de la dimerización **2.90** ($Cl_{50dim} = 4.2 \mu M$), disustituido con grupos fenilo en las posiciones 4- y 5- del tiazol, en las cuales se había observado un aumento muy importante de la capacidad desdimerizadora con respecto al derivado monosustituido en posición 4- **2.88** ($Cl_{50dim} = 30.1 \mu M$) (**Figura 3.11**).

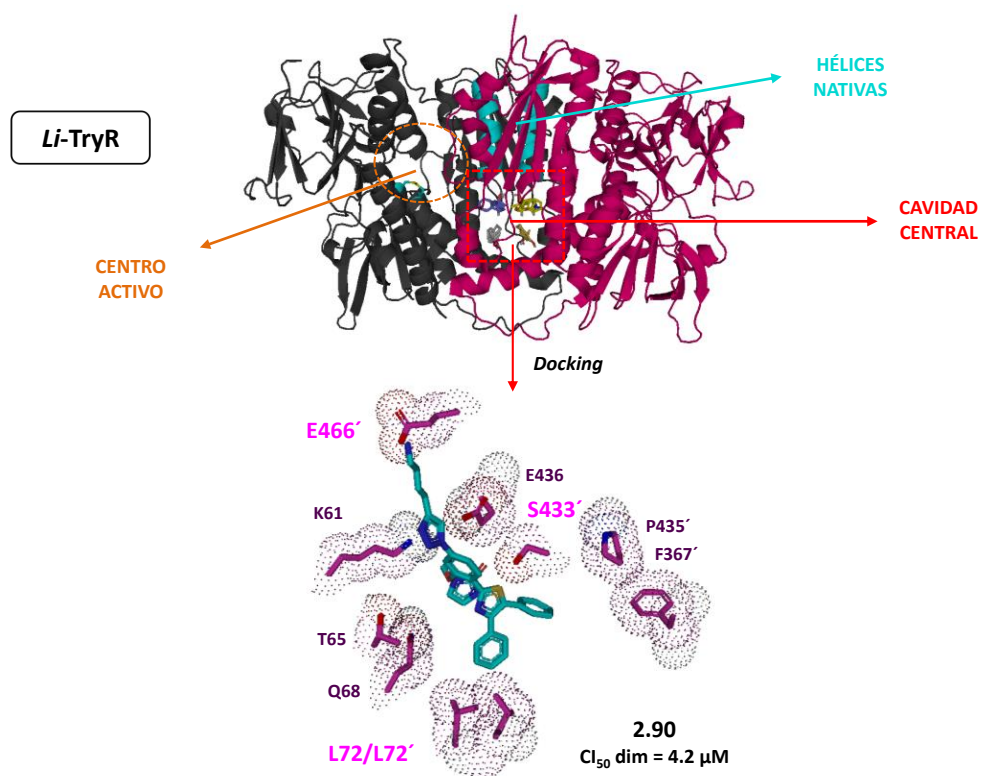


Figura 3.11. Estudios de *docking* en la cavidad central de *Li-TryR* (2JK6) con el disruptor disustituido en el tiazol **2.90**.

Según se observa en el modo de unión propuesto en la **Figura 3.11**, el ligando se extendería nuevamente a lo largo del túnel que conecta el centro activo con la cavidad central interfacial, de manera que la cadena lateral de butilamina de **R₁** establecería también una interacción electrostática con el Glu466'. El -NH del anillo de imidazolidinona podría establecer un enlace de hidrógeno con el residuo S433', de manera muy similar a la propuesta para **2.28**. En cuanto a los grupos fenilo unidos al tiazol, se observó que el de la posición 4- (**R₃**) podría orientarse hacia el bolsillo hidrófobo de P435' y F367', aunque sin llegar a interactuar con él como hacían los derivados monosustituidos anteriores. Por otro lado, el grupo fenilo de la posición 5- (**R₅**) se alojaría en otro de los bolsillos hidrófobos de la cavidad, previamente identificado por FTMap y definido por los residuos L72 y L72' de ambos monómeros, ocupando este hueco de manera más favorable. No obstante, a la vista de las tres poses de *docking* anteriores, la rotación del enlace entre los anillos de fenilo y tiazol del *scaffold* central parece posible por lo que los dos grupos fenilo de las posiciones -4 (**R₃**) y -5 (**R₅**) serían *a priori* interconvertibles.

Estudios adicionales de dinámica molecular llevados a cabo a partir de la mejor pose del derivado **2.90** en esta región de la enzima, mostraron que las interacciones principales del ligando con los residuos E466', S433' y con el bolsillo hidrófobo en las inmediaciones de L72/L72', se mantuvieron estables a lo largo de la simulación.

Por tanto, a la vista de estos resultados cabe señalar que el modelo de interacción propuesto en la cavidad central permitiría explicar las relaciones estructura-actividad de los inhibidores de la **Serie I**, donde se había visto la importancia de conservar en la estructura los sustituyentes de butilamino (**R₁**), imidazolidinona (**R₂**) y sustituyentes aromáticos voluminosos (**R₃**) para la inhibición de la dimerización. En el caso de **2.90** además, la mejora excepcional de la capacidad desdimerizadora como consecuencia de la introducción de un segundo anillo aromático directamente conjugado en la posición 5- del tiazol (**R₅**), podría explicarse mediante la interacción de este fenilo en un segundo bolsillo hidrófobo definido por el par de residuos de ambos monómeros L72-L72'. Sin embargo, como acabamos de mencionar, en este último derivado sólo se observó una ocupación parcial del bolsillo P435' y F367' por lo que cabría la posibilidad de optimizar las interacciones en esta zona explorando grupos hidrófobos más voluminosos y extendidos en posición **R₃** de los ligandos.

3.3.4. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados disustituídos en el anillo de tiazol

A partir de la pose del disruptor de dimerización **2.90**, decidimos a continuación llevar a cabo la síntesis de nuevos compuestos de la **Serie I** doblemente funcionalizados en las posiciones 4- y 5- del tiazol, con el objetivo de interaccionar simultáneamente en los dos bolsillos hidrófobos mencionados (P435'-F367' y L72-L72') de la cavidad interfacial, y especialmente de optimizar las interacciones en la primera región (**Figura 3.12**).

De esta manera, nos planteamos el diseño de nuevos compuestos disustituídos en el tiazol donde se mantiene el grupo fenilo de la posición 5- y se introducen grupos hidrófobos más voluminosos en la posición 4- (**R₃**), tanto unidos directamente al esqueleto central en analogía con **2.90**, como a través de un espaciador etilénico en analogía con **2.27** y **2.28** (**Figura 3.12**). Como grupos voluminosos se escogieron un grupo bifenilo y un grupo fenil-oxi-fenilo, este último con la intención de equilibrar la hidrofobicidad final del compuesto con su solubilidad acuosa.

DOCKING DE 2.90

NUEVOS LIGANDOS DISUSTITUIDOS

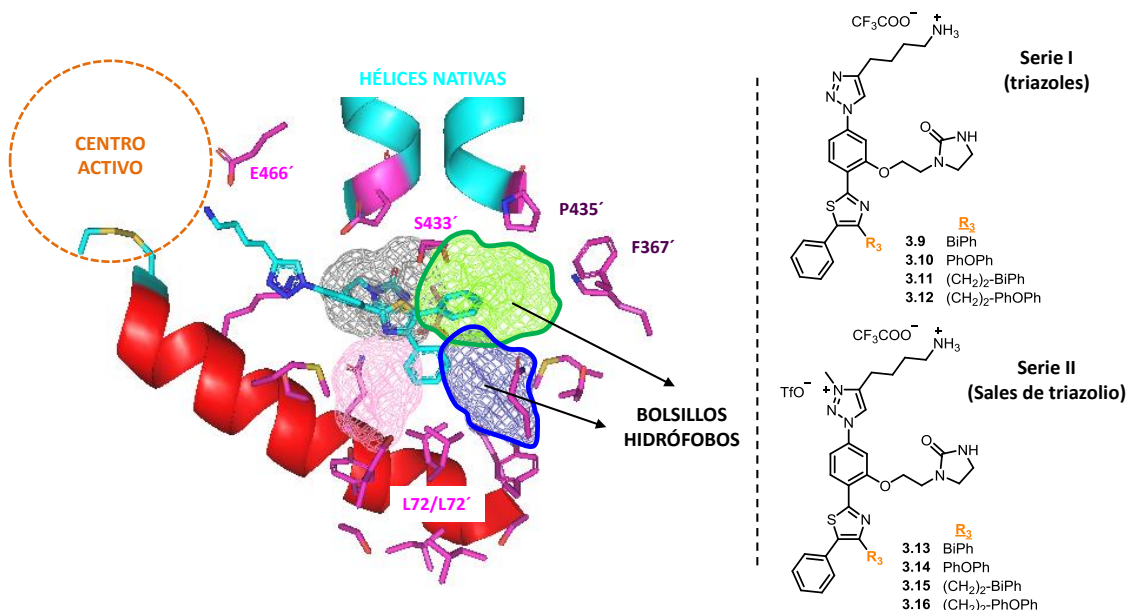
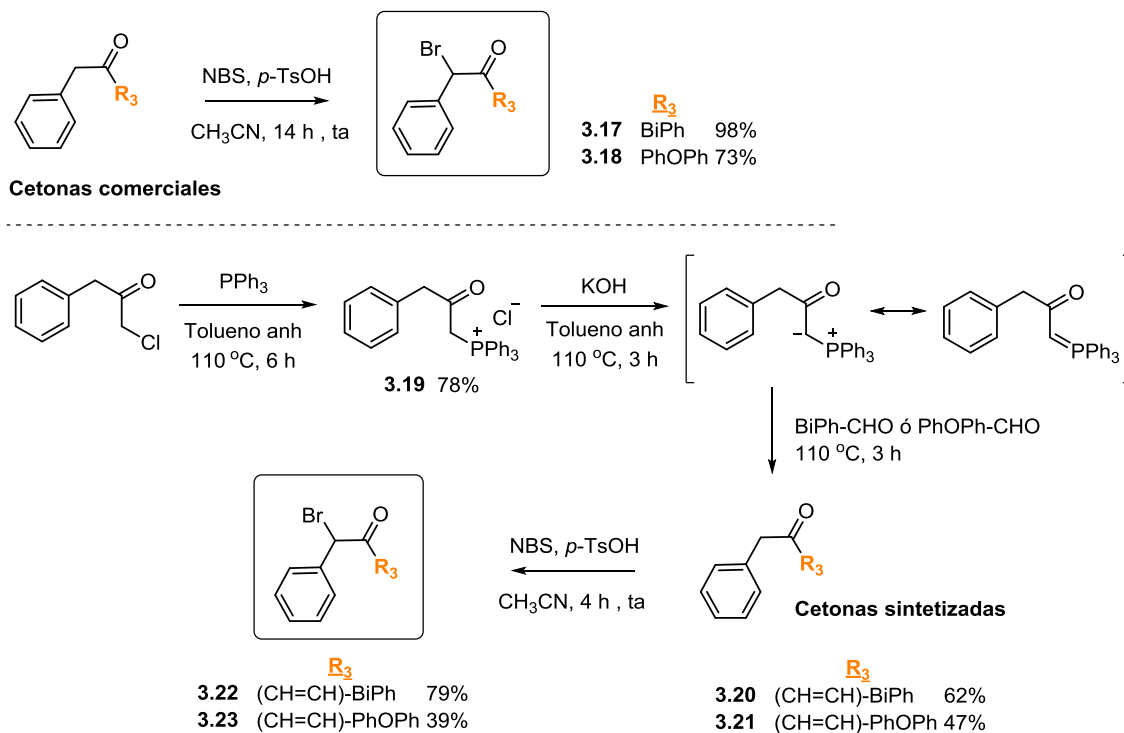


Figura 3.12. Diseño de nuevos ligandos disustituidos en el anillo de tiazol basado en el modelo de interacción propuesto en la cavidad interfacial de *Li-TryR*.

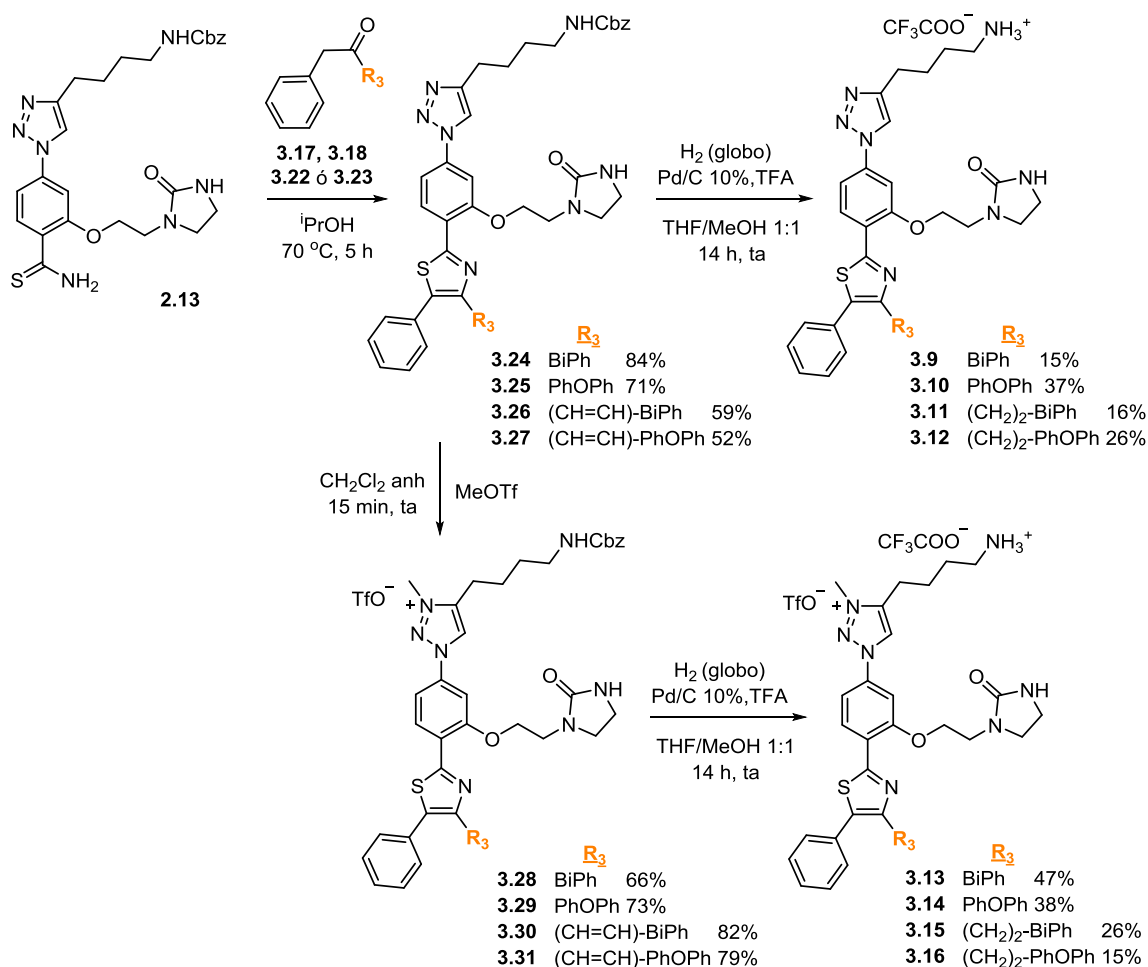
La síntesis de estos nuevos compuestos se llevó a cabo siguiendo los mismos procedimientos descritos en el **Capítulo 2**, para la cual fue necesaria, en primer lugar, la preparación de las correspondientes α -bromocetonas a partir de cetonas comerciales o sintetizadas (**Esquema 3.2**).



Esquema 3.2. Síntesis de las bromocetonas disustituidas **3.17**, **3.18**, **3.22** y **3.23**.

La síntesis de las bromocetonas **3.17** y **3.18** con grupos hidrófobos conjugados directamente al grupo carbonilo (**Esquema 3.2**), se realizó por bromación de las correspondientes cetonas comerciales con NBS en presencia de *p*-TsOH, con muy buenos rendimientos al tratarse en esta ocasión de una posición bencílica muy favorecida. Para la preparación de las bromocetonas α,β -insaturadas **3.22** y **3.23** se sintetizaron previamente las cetonas no comerciales **3.20** y **3.21** mediante reacción de Wittig entre los aldehídos aromáticos comerciales y la sal de fosonio **3.19**, obtenida a su vez a partir de 1-cloro-3-fenilpropan-2-ona por desplazamiento del halógeno con PPh_3 en un 78% de rendimiento. Para la reacción de Wittig se trató la sal **3.19** con KOH a 110 °C para acceder al iluro estabilizado correspondiente, que se hizo reaccionar *in situ* con los aldehídos aromáticos dando lugar a las cetonas α,β -insaturadas disustituidas **3.20** y **3.21** con rendimientos del 62 y 47% de rendimiento respectivamente. Finalmente, la bromación de la posición bencílica de las cetonas sintetizadas con NBS y *p*-TsOH en CH_3CN a temperatura ambiente durante 4 horas, permitió acceder a las bromocetonas **3.22** y **3.23** con rendimientos del 79 y del 39% respectivamente.

Una vez preparadas las bromocetonas, llevamos a cabo la síntesis de Hantzsch de tiazoles a partir de la tioamida **2.13** (**Esquema 3.3**).



Esquema 3.3. Síntesis de compuestos finales de las Series I y II disustituidos en el tiazol **3.9** - **3.16**.

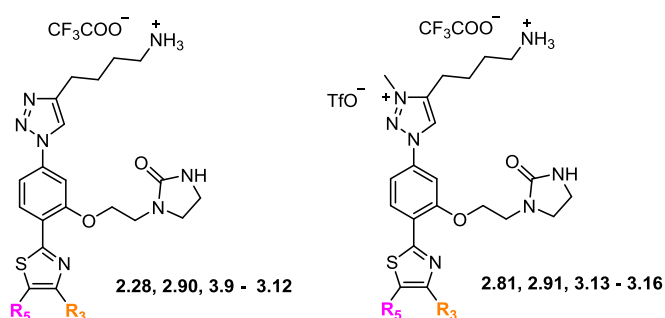
De este modo la reacción de la tioamida **2.13** con las bromocetonas sintetizadas **3.17**, **3.18**, **3.22** o **3.23** en ⁱPrOH a 70 °C durante 5 horas, permitió obtener los compuestos **3.24** - **3.27** en un 52 - 84% de rendimiento. La desprotección con H₂-Pd/C en medio ácido condujo a los triazoles disustituídos finales **3.9** - **3.12** (**Serie I**) con rendimientos comprendidos entre el 15 y el 37% tras purificación cromatográfica en fase inversa mediante Biotage™. Por otro lado, se llevó a cabo la metilación del triazol de los intermedios **3.24** - **3.27** con MeOTf en CH₂Cl₂ anhidro durante 15 min, para dar lugar a las sales de triazolio **3.28** - **3.31** con buenos rendimientos (66 - 82%). Finalmente, la hidrogenación de estos derivados con H₂ (globo) empleando Pd/C como catalizador en medio ácido de TFA permitió obtener los derivados finales de la **3.13** - **3.16** (**Serie II**) en forma de sales mixtas de triflato y trifluoroacetato, con rendimientos comprendidos entre el 15 y el 47% tras purificación cromatográfica en fase inversa.

Una vez sintetizados los compuestos disustituídos objetivo, se procedió a la evaluación biológica de los mismos comparando sus resultados con los derivados de referencia disustituídos en el tiazol **2.90** (**Serie I**) y **2.91** (**Serie II**), y con los mejores inhibidores monosustituídos de ambas series **2.28** y **2.81** respectivamente. Los resultados de los ensayos enzimáticos de inhibición de la actividad y de la dimerización se recogen en la **Tabla 3.2**.

En cuanto a los nuevos compuestos de triazol disustituídos, la introducción de grupos hidrófobos tanto unidos directamente al anillo de tiazol (**3.9** y **3.10**), como a través de un espaciador dimetilénico (**3.11** y **3.12**), no permitió mejorar ni la capacidad desdimerizadora ni en general la inhibición de la actividad oxidorreductasa de la enzima con respecto a los compuestos patrón **2.90** y **2.28**.

En lo que respecta a las nuevas sales de triazolio disustituídas, cabe señalar en primer lugar una mejora de 4 a 6 veces en los valores de Cl₅₀ act para los compuestos portadores de grupos poliaromáticos conjugados en el esqueleto central (**3.13** y **3.14** vs **2.91**), que los convierte en los inhibidores de la actividad oxidorreductasa de *Li*-TryR más potentes obtenidos hasta el momento. Sin embargo, en cuanto al ensayo de dimerización no se observó efecto para ninguna de las nuevas sales de triazolio disustituídas, poniendo en evidencia la pérdida de actividad de los derivados **3.15** y **3.16** en comparación con el compuesto prototipo **2.81**, que había resultado ser la única sal de triazolio con actividad significativa en el ensayo de dimerización.

Tabla 3.2. Evaluación biológica de los nuevos compuestos disustituidos **3.9 - 3.12** de la **Serie I** y **3.13 - 3.16** de la **Serie II**, tomando como referencia los triazoles **2.28** y **2.90**, y las sales de triazolio **2.81** y **2.91**. Se recogen los valores de $Cl_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).



Compuesto	Serie	R_5	R_3	$Cl_{50}act (\mu M)^a$	$Cl_{50}dim (\mu M)^a$
COMPUESTOS DE TRIAZOL (SERIE I)					
2.28	I	-H	-(CH ₂) ₂ -BiPh	10.9 \pm 1.8	4.8 \pm 0.6
2.90	I	-Ph	-Ph	5.8 \pm 1.6	4.2 \pm 1.9
3.9	I	-Ph	-BiPh	6.0 \pm 2.2	11.3 \pm 0.2
3.10	I	-Ph	-PhOPh	3.1 \pm 0.7	9.0 \pm 0.5
3.11	I	-Ph	-(CH ₂) ₂ -BiPh	20.0 \pm 1.3	5.7 \pm 0.5
3.12	I	-Ph	-(CH ₂) ₂ -PhOPh	11.7 \pm 1.3	8.3 \pm 0.3
SALES DE TRIAZOLIO (SERIE II)					
2.81	II	-H	-(CH ₂) ₂ -BiPh	5.2 \pm 0.8	9.5 \pm 0.8
2.91	II	-Ph	-Ph	9.3 \pm 0.9	>200
3.13	II	-Ph	-BiPh	1.5 \pm 0.7	>200
3.14	II	-Ph	-PhOPh	2.4 \pm 0.6	>200
3.15	II	-Ph	-(CH ₂) ₂ -BiPh	5.8 \pm 0.9	>200
3.16	II	-Ph	-(CH ₂) ₂ -PhOPh	3.4 \pm 0.3	>200

^a Concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la actividad o la formación del dímero.

A la vista de los resultados de la **Tabla 3.2** se puede concluir que los compuestos disustituidos de la **Serie I (3.9 - 3.12)**, diseñados en base al modelo de interacción propuesto en la cavidad central interfacial y que resultaron ser inhibidores potentes en el ensayo de dimerización, no mejoraron la capacidad desdimerizadora de los compuestos de referencia **2.90** o **2.28**, lo que no sustentaba nuestra hipótesis de diseño.

Por este motivo, nos planteamos, a continuación, el diseño de un nuevo tipo de derivados simétricos de triazol-fenil-tiazol para intentar apoyar el modelo de unión propuesto en la cavidad central interfacial.

3.3.5. Diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos simétricos

Una estrategia atractiva en el diseño de inhibidores enzimáticos, es aprovechar la simetría natural de enzimas oligoméricas para el diseño de ligandos simétricos que puedan presentar mejores afinidades y selectividades por la diana.¹⁴ En este contexto, un arquetipo de enzima homodimérica con eje de simetría C2 ampliamente utilizada para el diseño de estructuras simétricas o diméricas, ha sido la proteasa del VIH, para la que se han descrito una gran variedad de inhibidores simétricos o pseudosimétricos que interaccionan en el centro activo de la enzima.¹⁵

En nuestro caso, el eje de simetría C2 que atraviesa la cavidad central interfacial de *Li-TryR* representaba una oportunidad atractiva para el diseño de ligandos simétricos que pudiesen ocupar las dos subunidades de la enzima de manera simultánea. Esta estrategia podría dar lugar a inhibidores más potentes y con un mayor grado de especificidad por la enzima que los correspondientes análogos monoméricos, lo cual constituiría a su vez una evidencia de la validez del modelo de interacción propuesto en la cavidad central de la enzima.

Existen antecedentes de este tipo de estructuras diméricas en *TryR* a nivel de centro activo en las que se han conectado dos moléculas del inhibidor a través de espaciadores para aumentar la interacción con la enzima, y con ello la potencia del inhibidor.^{16,17} No obstante, el diseño de estos ligandos no se basa en la simetría de la enzima en la región de unión de los mismos, sino en el elevado tamaño del centro activo que tal y como se ha puesto de manifiesto en las estructuras cristalográficas de los inhibidores competitivos descritos en la introducción de esta memoria, permite albergar más de una molécula en el centro catalítico. Así por ejemplo, el dímero de fenotiazina **I12** (**Figura 3.13A**) fue capaz de mejorar en más de dos órdenes de magnitud la K_i frente a *Tc-TryR* respecto a su prototipo monomérico **I11**.¹⁸

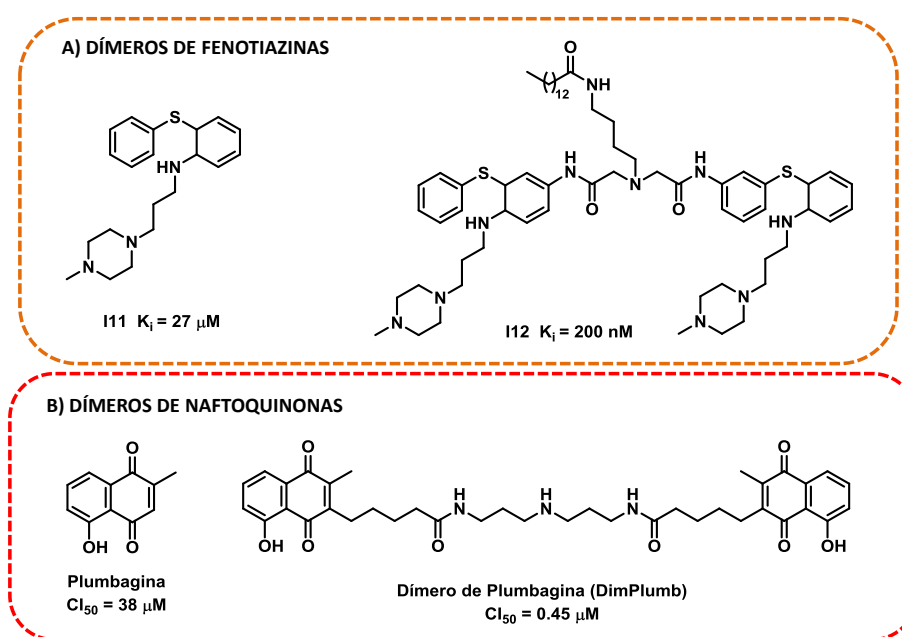


Figura 3.13. A) Estructuras diméricas basadas en fenotiazinas; **B)** Dímeros de Plumbagina.

Del mismo modo, los dímeros de bis-naftoquinonas (bis-NQs) con espaciadores de poliaminas⁸ diseñados para aumentar la afinidad por Tc-TryR de los inhibidores subversivos de menadiona y plumbagina, resultaron ser más de 80 veces más potentes que los ligandos monoméricos de referencia (**Figura 3.13B**), aunque no se ha estudiado su modo de unión a la enzima del parásito.

Con estos antecedentes decidimos abordar el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevas estructuras simétricas de bis-triazol-fenil-tiazol basadas en la propuesta del modo de unión en la cavidad interfacial de la enzima de los compuestos monoméricos.

- **Diseño del ligando simétrico prototipo 3.32 y análogos**

A partir de la mejor pose de *docking* del compuesto disustituido **2.90**, y teniendo en cuenta el tamaño y la simetría tanto de la cavidad central como de los principales túneles de acceso, diseñamos el ligando simétrico prototipo **3.32** (**Figura 3.14**), en el que nos planteamos la unión de las dos moléculas de ligando a través del sustituyente hidrófobo en **R₃** como espaciador.

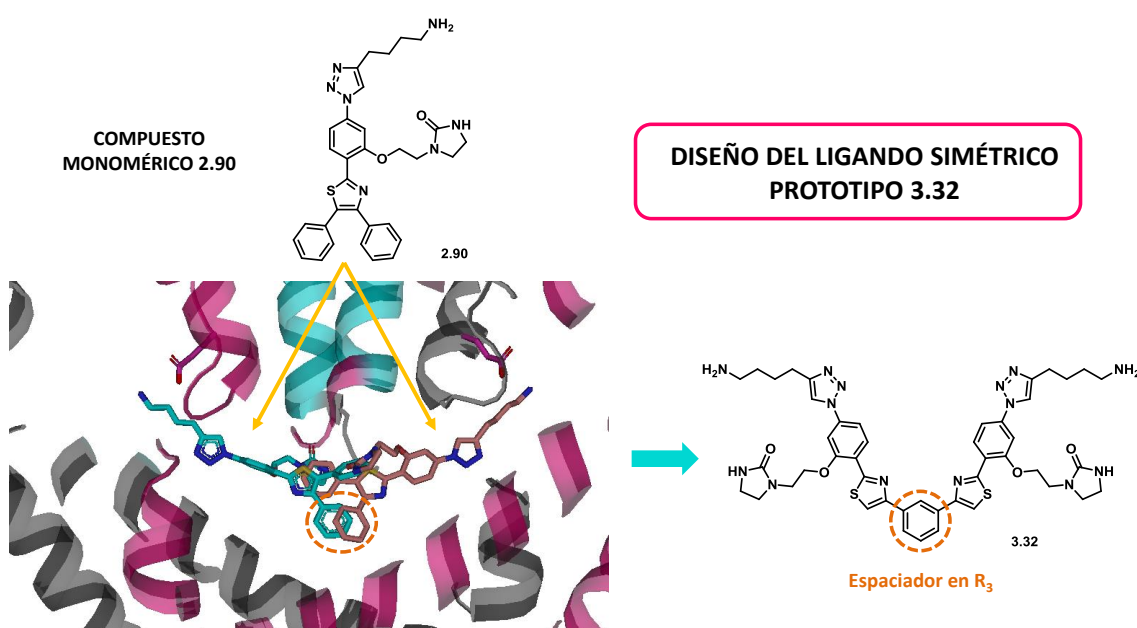


Figura 3.14. Diseño del ligando simétrico prototipo **3.32** a partir del modo de unión propuesto para el ligando monomérico **2.90**.

La superposición de la pose de **2.90** con su imagen especular (**Figura 3.14**) permitió diseñar el ligando simétrico prototipo **3.32**, portador de un anillo de benceno que actúa como espaciador para disponer los esqueletos de triazol-fenil-tiazol en la orientación adecuada para la interacción con la proteína.

A continuación se realizaron los estudios de *docking* con el derivado simétrico propuesto **3.32** en la cavidad central de *Li-TryR* empleando el programa AutoDock4. La pose de menor energía del complejo ligando-proteína se indica en verde en la **Figura 3.15**.

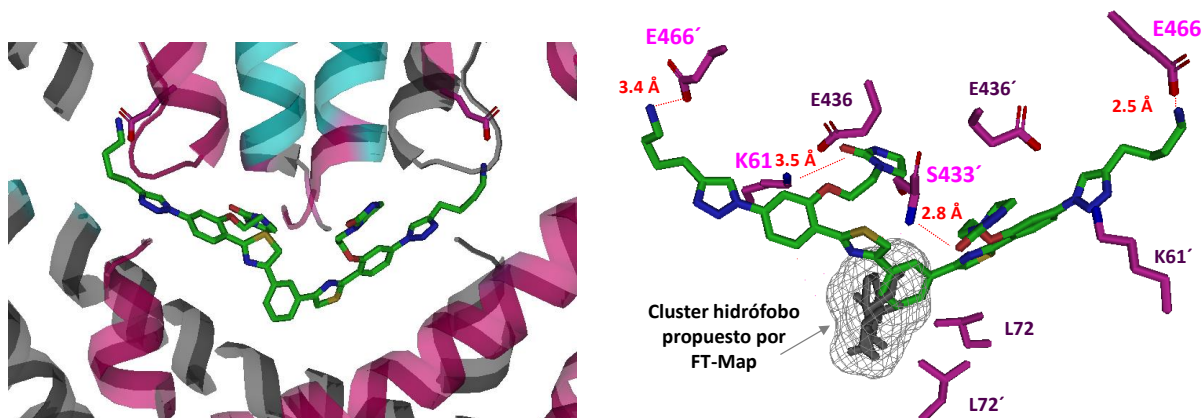


Figura 3.15. *Docking* del compuesto simétrico prototipo **3.32** en la cavidad central interfacial de *Li-TryR*.

En ella se pudo observar en primer lugar la correcta disposición de las dos partes del ligando ocupando simultáneamente los dos túneles de acceso y parte de la cavidad. En concreto, los dos grupos amonio terminales de los sustituyentes **R₁** se situarían a una distancia adecuada para establecer un puente salino con los residuos E466 y E466' de ambos monómeros de la enzima. Por otro lado, el espaciador que conecta las dos partes de la molécula a través de los anillos de tiazol, se alojaría en una de las regiones hidrófobas señaladas por FTMap próxima a los residuos L72 y L72'. Cabe señalar que bolsillo en la enzima homóloga humana hGR estaría constituido por los residuos F78 y F78' los cuales, de acuerdo con los complejos cristalizados con safranina⁷ o XAN¹⁰, juegan un papel importante en la interacción de estos compuestos tricíclicos mencionados anteriormente (ver página 158).

En lo que respecta a los anillos de imidazolidinona de **R₂**, en la pose de menor energía de la **Figura 3.15** se observó que el -CO de uno de los anillos podría establecer un enlace de hidrógeno con el -NH del esqueleto carbonado del residuo S433', mientras que el -CO de la otra imidazolidinona estaría en la distancia y orientación adecuadas para formar un enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo K61 del otro monómero. No obstante, cabe destacar nuevamente que la interacción de los anillos de imidazolidinona con la enzima varía habitualmente de una pose a otra del *docking*, no observándose convergencia en los resultados hacia una interacción preferente como sí ocurre con el sustituyente **R₁** o con el resto del esqueleto heterocíclico.

A partir del ligando simétrico prototipo **3.32**, se diseñaron a continuación nuevos compuestos simétricos con modificaciones estructurales tanto en el espaciador como en **R₂** (**Figura 3.16**). Así, con el objetivo de optimizar las interacciones hidrófobas en el bolsillo de la cavidad definido por L72 - L72', se decidió preparar los análogos extendidos **3.33** y **3.34**

sustituídos en posición 5- del espaciador con grupos metilo y fenilo. Por otro lado, con el fin de estudiar la importancia de la imidazolidinona en la actividad de los dímeros, se decidió preparar además el dímero modificado en **R₂** **3.35**.

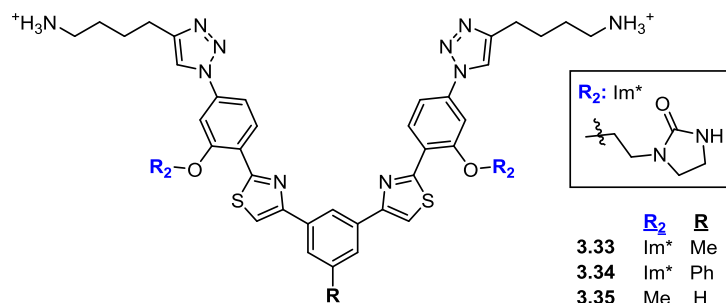
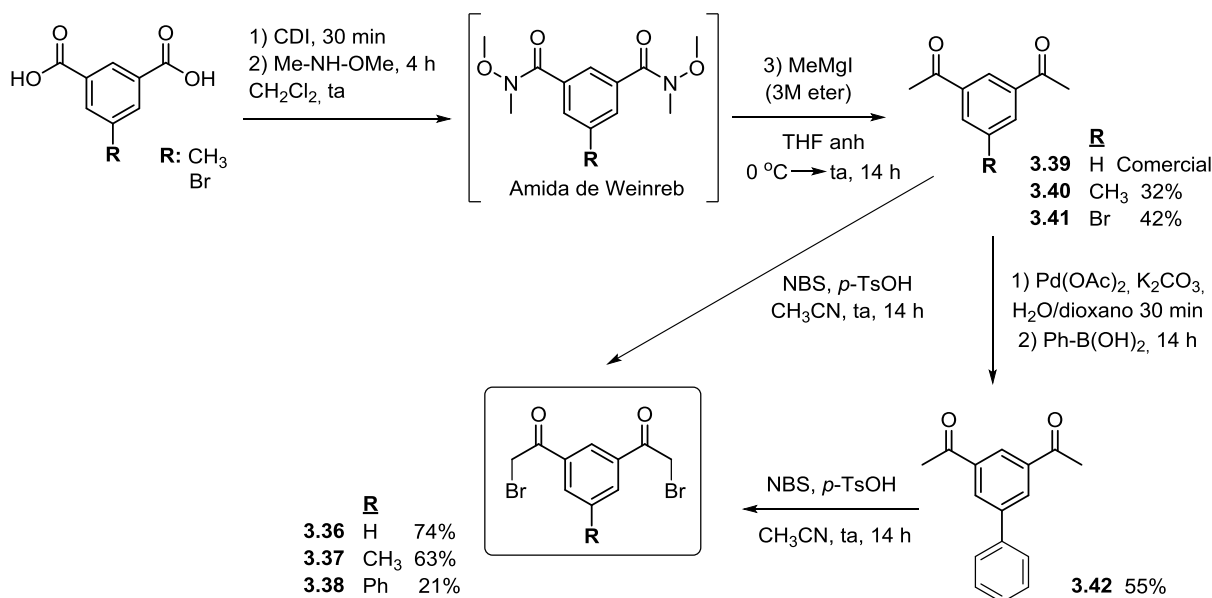


Figura 3.16. Estructuras simétricas diseñadas a partir del *docking* de **3.32** con Li-TryR.

• Síntesis de compuestos simétricos

Para la preparación de los compuestos simétricos diseñados en el apartado anterior, fue necesaria en primer lugar la síntesis de las α -dibromocetonas **3.36** - **3.38** que constituirían el espaciador aromático (**Esquema 3.4**). Además, en el caso de las bromocetonas **3.37** y **3.38** fue necesaria también la síntesis de las cetonas precursoras a partir de derivados del ácido isoftálico.

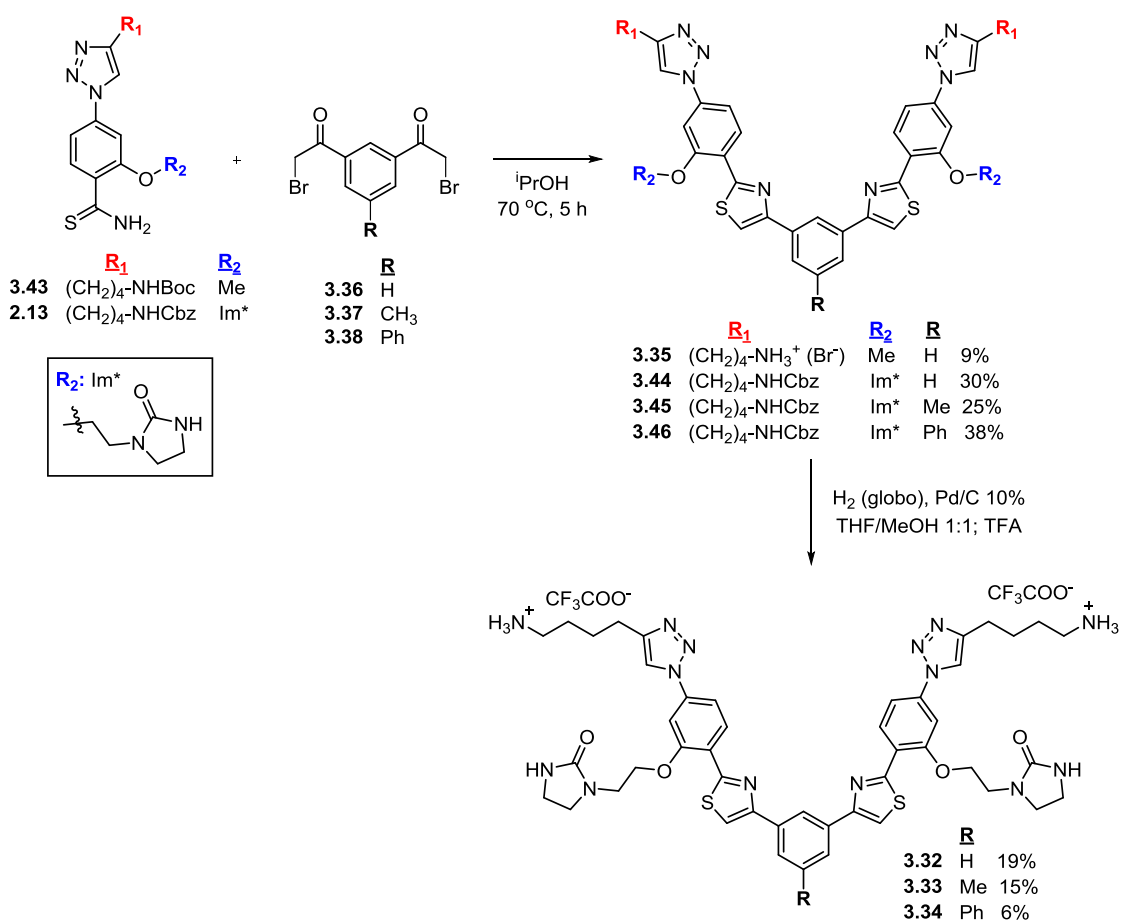


Esquema 3.4. Síntesis de las dibromocetonas **3.36** - **3.38**.

Así, la activación en primer lugar de los ácidos 5-metil- y 5-bromoisoftálico con 1,1-carbonildiimidazol (CDI), seguido de la sustitución con N,O-dimetilhidroxilamina en CH₂Cl₂ anhidro, dio lugar a las amidas de Weinreb correspondientes, las cuales se hicieron reaccionar *in situ* con una disolución 3M de MeMgI en éter para obtener las arildicetonas 5-sustituídas

3.40 y **3.41** en un 32% y un 42% de rendimiento, respectivamente.¹⁹ Adicionalmente, para la preparación de la dicetona de bifenilo **3.42** se llevó a cabo una reacción de Suzuki-Miyaura²⁰ empleando el bromuro de arilo **3.41**, previamente sintetizado, y el ácido fenilborónico comercial, utilizando Pd(OAc)₂ como catalizador en medio básico. En esas condiciones, se obtuvo el producto de acoplamiento **3.42** en un 55% de rendimiento. Por último, el tratamiento de las dicetonas **3.39**, **3.40** y **3.42** con NBS y *p*-TsOH en CH₃CN a temperatura ambiente durante toda la noche, condujo a las α-dibromocetonas **3.36** - **3.38** con rendimientos comprendidos entre el 21 y el 74% tras purificación cromatográfica.

Una vez obtenidas las bromocetonas correspondientes, se llevó a cabo la síntesis de Hantzsch de tiazoles a partir de los intermedios de tioamida protegidos **2.13** (Cbz) y **3.43** (Boc), este último por motivos de disponibilidad sintética (**Esquema 3.5**).



Esquema 3.5. Síntesis de los compuestos simétricos **3.32** - **3.35**.

De este modo, la reacción entre la dibromocetona **3.36** con 2 equivalentes de la tioamida Boc-protégida **3.43** en *i*PrOH a 70 °C, condujo directamente al compuesto simétrico final **3.35** como consecuencia de la desprotección del grupo -Boc durante la ciclación. Este producto se obtuvo en un 9% de rendimiento tras purificación cromatográfica por HPLC-semipreparativo.

inhibición cercanos o incluso superiores a los del inhibidor monomérico más potente **2.90** en el ensayo de actividad, y comparables a los del péptido de referencia **P1** en ambos estudios.

En cuanto a las SAR, se observó que la introducción de un grupo -Me o -Ph en el espaciador de los compuestos simétricos **3.33** y **3.34**, respectivamente, dio lugar a una pérdida relevante de la actividad oxidorreductasa (10 veces) con respecto al compuesto simétrico no sustituido **3.32**, manteniéndose no obstante una buena capacidad desdimerizadora de los ligandos simétricos modificados en el puente. Asimismo, la presencia del grupo imidazolidinona en **R₂** del compuesto simétrico **3.35** parece jugar un papel importante en la inhibición de la actividad oxidorreductasa de la enzima, puesto que se observó la pérdida en un orden de magnitud de su capacidad inhibitoria con respecto al prototipo **3.32**. Sin embargo, la ausencia del grupo imidazolidinona en **3.35** no parece afectar en cambio a la capacidad desdimerizadora del compuesto (CI₅₀ dim similares).

Los buenos resultados obtenidos para el compuesto simétrico de bis-triazol-fenil-tiazol prototipo **3.32** respecto al compuesto monomérico de referencia **2.88**, apoyaría el modelo de interacción de los compuestos en la cavidad central de la interfaz de *Li-TryR* propuesto.

Como hemos mencionado anteriormente, existen evidencias experimentales de complejos cristalizados de safranina y otros inhibidores policíclicos con hGR donde estos ligandos ocupan la cavidad central interfacial de la enzima homóloga humana. Con el fin de obtener evidencias indirectas que nos permitiesen apoyar todavía más nuestra hipótesis de interacción en la cavidad central de *Li-TryR*, decidimos llevar a cabo a continuación estudios de competición de nuestro compuesto simétrico prototipo **3.32** con safranina.

- **Estudio de competición del compuesto simétrico prototipo 3.22 con safranina**

A pesar de que no hay evidencias experimentales de R-X que confirmen la unión de safranina a la cavidad central interfacial de la TryR del parásito (estos estudios se están realizando en la actualidad), estudios comparativos preliminares de esta región en hGR y en *Li-TryR* sugieren que la safranina podría interaccionar de manera similar en la cavidad central de la enzima del parásito.

Siguiendo con esta hipótesis, decidimos llevar a cabo estudios de competición del compuesto simétrico **3.32** con safranina. Para ello, se incubó la *Li-TryR* durante 16 horas con distintas concentraciones de safranina (0 - 500 µM), en presencia (10 µM) y ausencia del compuesto **3.32**, y se analizó a continuación el sobrenadante mediante *western blot* para comprobar si se había producido precipitación de la enzima (**Figura 3.17**). Este fenómeno de precipitación podría relacionarse a su vez con la capacidad desdimerizadora de los compuestos tal y como se vio en los ensayos de precipitación descritos en las páginas 149 y 150.

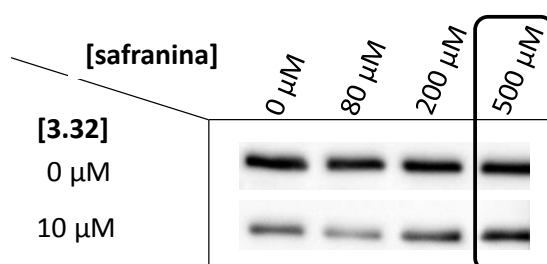


Figura 3.17. Western blot de la proteína en presencia y ausencia de **3.32** y distintas concentraciones de safranina.

Como puede apreciarse, el tratamiento de la enzima sólo con safranina, incluso a altas concentraciones (500 μM), no dio lugar a la precipitación de la proteína, indicando que este compuesto *a priori* no se comporta como un disruptor del homodímero. Por otro lado, en presencia del compuesto simétrico **3.32** a una baja concentración de 10 μM y en ausencia de safranina, sí se observó una disminución muy clara de la cantidad de proteína en el sobrenadante (**Figura 3.17**), como cabía esperar teniendo en cuenta la capacidad desdimerizadora de este compuesto ($\text{Cl}_{50 \text{ dim}} = 8.0 \mu\text{M}$). Sin embargo, el co-tratamiento de **3.32** con concentraciones crecientes de safranina reveló la capacidad de esta última para reducir la capacidad desdimerizadora del compuesto simétrico, observándose un efecto dosis-dependiente especialmente a altas concentraciones de safranina.

A la vista de estos prometedores resultados, en segundo lugar se realizaron experimentos ELISA para cuantificar la señal correspondiente al homodímero presente en los sobrenadantes anteriores. Los resultados se muestran en la **Figura 3.18** donde el 100% de la señal de la enzima se asigna al valor de la señal en ausencia de ligandos.

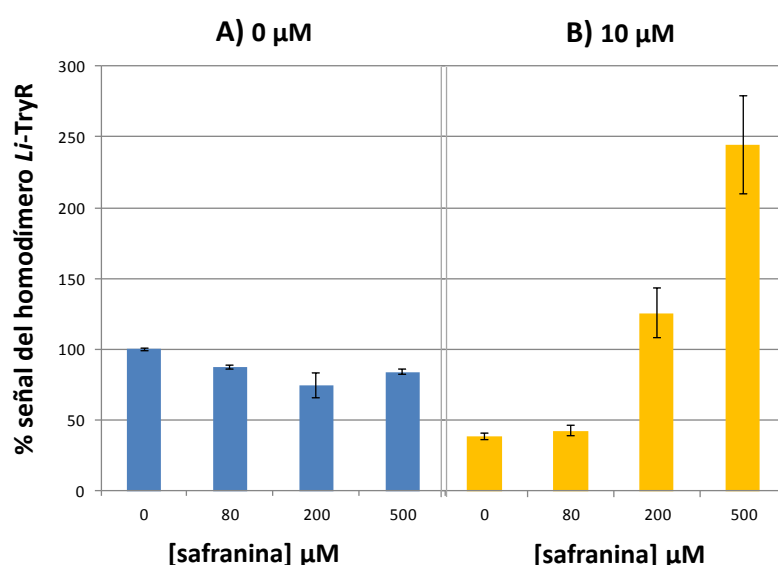


Figura 3.18. Cuantificación mediante ensayo ELISA de la cantidad relativa de homodímero en ausencia y presencia de **3.32** (10 μM) y diferentes concentraciones de safranina.

De este modo se pudo observar como en presencia de distintas concentraciones de safranina y ausencia de nuestro ligando **3.32** (**Figura 3.18A**), sólo se detectó una pequeña disminución del porcentaje de homodímero en torno a un 20%, incluso a altas concentraciones de safranina (500 μ M). Sin embargo, la co-incubación con **3.32** y concentraciones crecientes de safranina (**Figura 3.18B**), sí permitió observar, en línea con los ensayos de precipitación, como esta última es capaz no sólo de reducir el efecto desdimerizador del compuesto simétrico **3.32** recuperándose la señal del homodímero, sino que incluso puede dar lugar a un posible efecto estabilizador a altas concentraciones. Este efecto competitivo podría indicar que ambos compuestos se unen al mismo sitio de la *Li*-TryR

Los esfuerzos actuales se centran en intentar cristalizar el complejo de safranina con *Li*-TryR para confirmar experimentalmente su interacción en la cavidad central de la enzima del parásito, lo que validaría indirectamente la hipótesis de interacción de nuestros inhibidores de dimerización en la cavidad central.

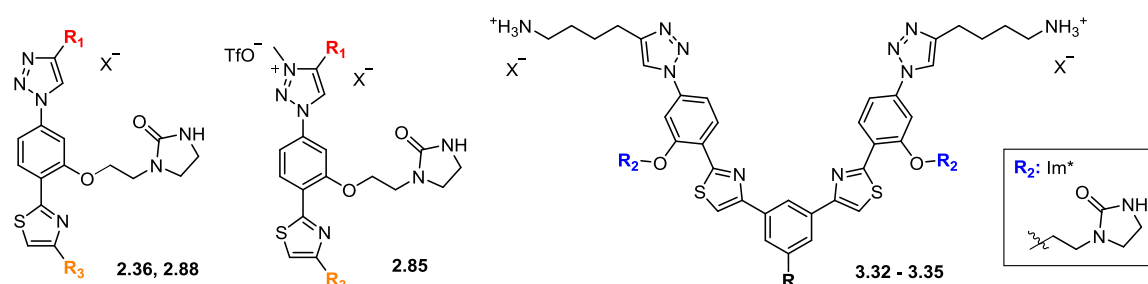
- **Evaluación de la actividad leishmanicida y de la citotoxicidad de los compuestos simétricos**

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación biológica de los compuestos simétricos **3.32** - **3.35** en cultivo celular frente a amastigotes axénicos y líneas celulares humanas. Los resultados se muestran en la **Tabla 3.4** donde se compara el efecto leishmanicida con el derivado monomérico de referencia **2.88**, y con los compuestos más potentes y selectivos de las **Serie I** y **II** portadores de un grupo propilamina en **R₁** (**2.36** y **2.85**, respectivamente).

En primer lugar, se pudo apreciar como todos los compuestos simétricos presentaron tanto una excelente actividad leishmanicida, en el rango micromolar bajo, frente a amastigotes axénicos, como una baja citotoxicidad.

El compuesto simétrico prototipo **3.32** por su parte, mostró un efecto leishmanicida 4 veces más potente que el compuesto monomérico de referencia **2.88**. En cuanto a las SAR, la introducción de un grupo -Me en el espaciador (**3.33**) condujo, por un lado, a una pérdida de actividad respecto a los otros derivados simétricos, y por otro lado, dio lugar a un mayor valor de citotoxicidad que se tradujo en peores IS que el prototipo **3.32**. Por el contrario, la introducción de un grupo -Ph en el espaciador (**3.34**) dio lugar no sólo a muy buenas actividades leishmanicidas, sino también a buenos valores de citotoxicidad que han conducido a IS mayores de 17, superiores a los de los derivados de propilamina **2.36** y **2.85**, que habían resultado hasta este momento los compuestos más potentes y selectivos de cada serie en este trabajo. Finalmente, el compuesto modificado en **R₂** **3.35** destacó también por su baja toxicidad, a diferencia de lo que ocurría con los derivados monoméricos modificados en esta posición para los que la eliminación de la imidazolidinona daba lugar a mayores toxicidades.

Tabla 3.4. Evaluación *in vitro* de los compuestos simétricos **3.32** - **3.35** y de los inhibidores monoméricos **2.36**, **2.85** y **2.88** para su comparación, frente amastigotes axénicos de *L. infantum* y células humanas HepG2. Se recogen los valores de $CE_{50} \pm DE$ (desviación estándar) (μM).



Compuesto	R_1	R_2	R_3	R	CE_{50} amastigotes (μM) ^a	CE_{50} HepG2 (μM) ^a	IS^b
2.88	$-(CH_2)_4-NH_3^+$	-Im	-Ph	/	17.0 ± 4.5	30.4 ± 6.2	1.8
2.36	$-(CH_2)_3-NH_3^+$	-Im	$-(CH_2)_2$ -Bifenil	/	5.2 ± 0.3	60.4 ± 3.0	11.6
2.85	$-(CH_2)_3-NH_3^+$	-Im	$-(CH_2)_2$ -Bifenil	/	4.8 ± 0.3	≥ 75	≥ 15.6
3.32	/	-Im	/	-H	4.4 ± 0.3	44.6 ± 2.7	10.1
3.33	/	-Im	/	-Me	10.0 ± 0.4	34.7 ± 3.9	3.5
3.34	/	-Im	/	-Ph	4.5 ± 0.2	≥ 75	≥ 17
3.35	/	-Me	/	-H	9.6 ± 0.4	≥ 75	≥ 7.8

^a CE_{50} es la concentración del compuesto que causa una disminución del 50% de la concentración de parásitos o de células humanas; ^b Índice de selectividad frente a amastigote.

Por tanto, a la vista de estos resultados biológicos podemos concluir que los compuestos simétricos estudiados no sólo han resultado ser inhibidores potentes de la actividad oxidorreductasa y del proceso de dimerización de *Li-TryR*, sino que además presentan un efecto leishmanicida potente y selectivo, similar a los mejores compuestos monoméricos sintetizados hasta el momento.

3.4. Conclusiones

En este **Capítulo 3** se ha abordado el estudio del mecanismo de inhibición de *Li*-TryR por parte de los compuestos más representativos del **Capítulo 2**, y se ha explorado su posible modo de unión a la enzima que explica las relaciones estructura-actividad biológica observadas, y que ha permitido diseñar nuevos análogos más potentes que apoyan las hipótesis de interacción propuestas.

Las conclusiones más relevantes se comentan a continuación:

- Los estudios de reversibilidad de la inhibición enzimática han demostrado que los compuestos de triazol y sales de triazolio, al igual que el péptido prototipo **P1**, se comportan como inhibidores irreversibles de la *Li*-TryR debido a que inducen la precipitación del homodímero. Este fenómeno de precipitación se ha podido correlacionar con la capacidad desdimerizadora de los compuestos, y se acentúa cuando la enzima se encuentra en funcionamiento.
- Los estudios de cinética enzimática llevados a cabo con las sales de triazolio más potentes y solubles **2.80** y **2.81** de la **Serie II**, demuestran que se trata de inhibidores irreversibles de unión lenta o tiempo-dependientes, con K_i de 0.5 y 1.8 μM respectivamente, similares a las del péptido prototipo **P1** ($K_i = 0.5 \mu\text{M}$) y aproximadamente 20 veces inferiores a la de la mepacrina ($K_i = 19 \mu\text{M}$). Sin embargo, a diferencia del péptido **P1** los compuestos **2.80** y **2.81** presentaron un carácter competitivo que parece sugerir un sitio de interacción diferente al de la hélice α interfacial que mimetizaba el péptido.
- A pesar de que no ha sido posible la cristalización de los disruptores de dimerización más representativos del **Capítulo 2**, debido a la precipitación de la proteína asociada con el mecanismo de inhibición de estos compuestos, sí ha sido posible la obtención de la estructura cristalina del complejo de la sal de triazolio **2.79** (inactiva en el ensayo de dimerización) con *Li*-TryR, donde se ha podido comprobar que el ligando interacciona en el sitio de unión de mepacrina (MBS) del centro activo de la enzima.
- A partir de la estructura cristalina del complejo **2.79** - *Li*-TryR, se diseñó la sal de triazolio **3.8** modificada en **R₂** con un residuo de piperidina, que ha resultado ser 4 veces más activa que **2.79** en el ensayo de actividad oxidoreductasa. En la estructura cristalizada del complejo **3.8** - *Li*-TryR se ha podido observar la interacción de este nuevo sustituyente en **R₂** con el residuo de Glu18 a través de un puente salino, lo que confirma la hipótesis de diseño. Por otro lado, se ha cristalizado también el primer complejo de *Li*-TryR con un triazol de la **Serie I** correspondiente al derivado de piperidina **3.6** (análogo de **3.8**), donde se han observado diferencias sustanciales en el modo de unión de este ligando respecto a las sales anteriores, relacionadas con la disposición espacial y el impedimento estérico del triazol metilado.

- Para los disruptores de dimerización **2.27**, **2.28** y **2.90**, se ha propuesto un modelo de interacción en una cavidad central hidrófoba situada en el dominio de dimerización de la *Li*-TryR. A pesar de que existen ligandos cristalizados en una cavidad similar de la enzima homóloga humana hGR (ej: safranina), no se ha explorado la unión de ligandos en esta región de la TryR de parásitos, por lo que la hipótesis de interacción en esta cavidad central interfacial resulta muy novedosa.
- Basándonos en este modelo de unión en la interfaz, se han diseñado nuevos compuestos disustituídos en el anillo de tiazol con grupos aromáticos más voluminosos y extendidos (**3.9** - **3.13**), con el objetivo de optimizar la ocupación de dos bolsillos hidrófobos de la cavidad central definidos por los residuos L72-L72' y P435'-F367', respectivamente. A pesar de que se han conseguido inhibidores de dimerización potentes con esta estrategia, no se ha mejorado la capacidad desdimerizadora del compuesto disustituído de referencia **2.90**.
- El diseño de ligandos simétricos (**3.32** - **3.35**) en la cavidad central interfacial, sí ha resultado una estrategia exitosa que ha dado lugar a disruptores de dimerización hasta 4 veces más potentes que el inhibidor monomérico de referencia **2.88**, lo que podría apoyar el modelo de interacción de los compuestos en la interfaz de dimerización. Los experimentos de competición del ligando simétrico prototipo **3.32** con safranina (un inhibidor de hGR cristalizado en la cavidad central de la enzima humana), han reforzado el modelo de unión propuesto. Finalmente, los compuestos simétricos **3.32** - **3.35** han demostrado ser agentes leishmanicidas potentes y selectivos, similares a los mejores compuestos monoméricos obtenidos hasta el momento.

3.5. Bibliografía

- (1) Londoño, M. A. Diseño y evaluación de inhibidores peptídicos dirigidos a la interfaz de dimerización de la tripanotión reductasa. **2017**, Universidad de Alcalá.
- (2) Bonse, S.; Santelli-Rouvier, C.; Barbe, J.; Krauth-Siegel, R. L. Inhibition of *trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by acridines: Kinetic studies and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (26), 5448–5454. <https://doi.org/10.1021/jm990386s>.
- (3) Lucio, H. de. Inhibición de la tripanotión reductasa de *Leishmania infantum* mediada por peptidomiméticos de la hélice $\alpha 2$ de la interfaz de dimerización, 2018, Universidad de Alcalá.
- (4) Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (8), 2603–2612. <https://doi.org/10.1021/jm900185q>.
- (5) Kozakov, D.; Grove, L. E.; Hall, D. R.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Luo, L.; Xia, B.; Beglov, D.; Vajda, S. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (5), 733–755. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>.
- (6) Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H.; Schirmer, R. H. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (5), 690–715. <https://doi.org/10.1002/anie.200300639>.
- (7) Karplus, P. A.; Pal, E. F.; Schulz, G. E. A crystallographic study of the glutathione binding site of glutathione reductase at 0.3-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *178* (3), 693–703. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14500.x>.
- (8) Salmon-Chemin, L.; Buisine, E.; Yardley, V.; Kohler, S.; Debreu, M. A.; Landry, V.; Sergheraert, C.; Croft, S. L.; Krauth-Siegel, R. L.; Davioud-Charvet, E. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and *in vitro* cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (4), 548–565. <https://doi.org/10.1021/jm001079l>.
- (9) Schönleben-Janasz, A.; Kirsch, P.; Mittl, P. R. E.; Schirmer, R. H.; R. Luise Krauth-Siegel, R. L. Inhibition of human glutathione reductase by 10-arylisoxaloxazines: Crystallographic, kinetic, and electrochemical studies. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1549–1554 <https://doi.org/10.1021/JM950511+>.
- (10) Savvides, S. N.; Karplus, P. A. Kinetics and crystallographic analysis of human glutathione reductase in complex with a xanthene inhibitor. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (14), 8101–8107. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8101>.
- (11) Petřek, M.; Otyepka, M.; Banáš, P.; Košinová, P.; Koča, J.; Damborský, J. CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics.* **2006**, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-316>.
- (12) Pavelka, A.; Sebestova, E.; Kozlikova, B.; Brezovsky, J.; Sochor, J.; Damborsky, J. CAVER: Algorithms for analyzing dynamics of tunnels in macromolecules. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma.* **2016**, *13* (3), 505–517. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2459680>.
- (13) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (14) Camille Wermuth. The practice of Medicinal Chemistry. *Elsevier*. **2003**, 251–260.

- (15) J.W.Erickson. Perspectives in Drug Discovery and Design. *Springer*. **1993**; 109–128.
- (16) Khan, M. O. F. Trypanothione reductase: A viable chemotherapeutic target for antitrypanosomal and antileishmanial drug design. *Drug Target Insights*. **2007**, 2 (2), 129–146. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1032037>.
- (17) Chibale, K.; Musonda, C. The synthesis of parasitic cysteine protease and trypanothione reductase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10 (18), 1863–1889. <https://doi.org/10.2174/0929867033456963>.
- (18) Girault, S.; Davioud-Charvet, E.; Maes, L.; Dubremetz, J.-F.; Debreu, M.-A.; Landry, V.; Sergheraert, C. Potent and specific inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: Bis(2-aminodiphenylsulfides) for fluorescent labeling studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9 (4), 837–846. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00312-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00312-6).
- (19) Hoffmann, C. S. K. G. K. PCT Int. Appl. WO2012139775A1, **2012**.
- (20) Hoffmann, I.; Blumenröder, B.; Onodi neé Thumann, S.; Dommer, S.; Schatz, J. Suzuki cross-coupling in aqueous media. *Green Chem.* **2015**, 17 (7), 3844–3857. <https://doi.org/10.1039/C5GC00794A>.
- (21) Ardèvol, A. Métodos de simulación QM/MM y de mecánica estadística: Una aproximación teórica a la Biología Molecular. *An. Quim.* **2013**, 109 (4), 268–275.
- (22) El Hage, K.; Mondal, P.; Meuwly, M. Free energy simulations for protein-ligand binding and stability. *Mol. Simul.* **2018**, 44 (13–14), 1044–1061. <https://doi.org/10.1080/08927022.2017.1416115>.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo inicial de esta Tesis Doctoral era el de obtener disruptores no peptídicos del proceso de dimerización de la tripanotión reductasa de *L. infantum* (*Li-TryR*), con mejores propiedades farmacocinéticas que los péptidos y peptidomiméticos desarrollados anteriormente en el grupo de investigación, con el fin último de identificar compuestos basados en moléculas pequeñas con actividad leishmanicida potente y selectiva que pudiera dar lugar a posibles candidatos para ensayos *in vivo*.

Con la intención de alcanzar los objetivos propuestos, en el **Capítulo 1** se han diseñado y sintetizado proteomiméticos de 5-6-5 imidazol-fenil-tiazol, en los que los derivados portadores de grupos naftilo y bifenilo en **R₃** han resultado ser los primeros inhibidores descritos de *Li-TryR* con carácter de molécula pequeña, capaces de alterar el estado homodimérico de la enzima, aunque de manera moderada e inferior a la del péptido prototipo **P1**. Estos compuestos han sido capaces de mostrar además actividad leishmanicida en cultivo celular frente a parásito extra- e intracelular, aunque con bajos índices de selectividad.

A partir de estos proteomiméticos, en el **Capítulo 2** de esta memoria se ha diseñado mediante *scaffold hopping* una amplia librería de compuestos basada en un esqueleto no descrito de 5-6-5 triazol-fenil-tiazol (**Serie I**) y sus correspondientes sales de triazolio (**Serie II**), cuya novedad estructural junto con los buenos resultados biológicos obtenidos con estos derivados, ha permitido presentar una patente europea extendida a PCT en el año 2018.

Estos compuestos han resultado ser inhibidores muy potentes, en el rango micromolar bajo, tanto de la actividad oxidorreductasa de la *Li-TryR* (especialmente los compuestos de la **Serie II**), como de la dimerización de la enzima (fundamentalmente la **Serie I** de triazoles). Los disruptores de dimerización más potentes **2.27**, **2.28** o el derivado disustituido en el tiazol **2.90**, han llegado a mostrar valores de CI_{50} dim similares o incluso inferiores a los del péptido prototipo **P1**, por lo que el objetivo de obtener disruptores no peptídicos potentes de la dimerización de *Li-TryR*, se ha alcanzado con éxito en este trabajo.

Algunos compuestos como la sal de triazolio **2.85**, han mostrado actividad leishmanicida potente ($CE_{50} \approx 4 \mu M$) con IS muy superiores a los de los péptidos y a los de los imidazoles del **Capítulo 1**, lo que permite concluir que también se han logrado alcanzar los objetivos planteados en este sentido y supone a su vez un gran estímulo para continuar la investigación con los derivados más potentes y selectivos en ensayos celulares, que presenten una buena solubilidad en agua y mejores propiedades como fármaco como candidatos para ensayos *in vivo* en ratones.

Estos compuestos presentan además una excelente solubilidad acuosa y unas propiedades fluorescentes muy interesantes que podrían complementar y potenciar su aplicabilidad como moléculas bioactivas.

CONCLUSIONES GENERALES

En el **Capítulo 3** se ha llevado a cabo la caracterización del mecanismo de inhibición de *Li*-TryR de estos compuestos, lo que ha permitido comprobar que estamos ante los primeros inhibidores irreversibles de *Li*-TryR basados en moléculas pequeñas, que dan lugar a la precipitación de la proteína. Además, no sólo es destacable el tipo de inhibición de estos compuestos, sino también su potencia, ya que los inhibidores estudiados **2.80** y **2.81** poseen una K_i de 0.5 y 1.8 μM , similar a la del péptido **P1** y mucho mejor que la del inhibidor de referencia mepacrina.

Finalmente, en el tercer capítulo se ha estudiado también el modo de unión de los compuestos con la enzima mediante cristalografía de R-X y herramientas computacionales.

En el caso de los ligandos no desdimerizadores, se han cristalizado en complejo con la *Li*-TryR y se ha podido comprobar la localización de estos compuestos en el centro activo de la enzima, lo que explicaría el carácter competitivo de las sales de triazolio observado en los estudios cinéticos.

Para los disruptores de dimerización, se ha propuesto un modelo de interacción con la enzima en una cavidad central interfacial, accesible desde el expuesto centro activo de la misma a través de un túnel que conecta ambas regiones, que explicaría los resultados SAR observados (**Figura 3.19**).

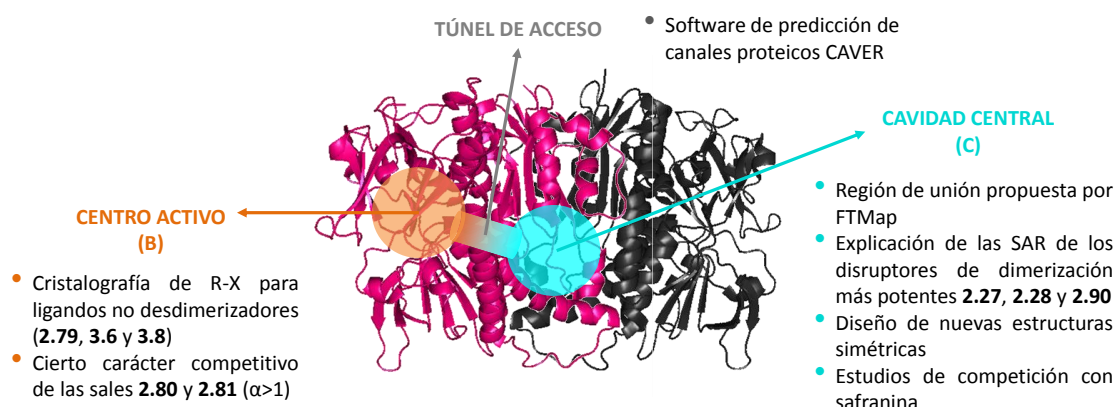


Figura 3.19. Modelo de interacción de los compuestos con *Li*-TryR propuesto. Se resumen los resultados obtenidos y los estudios realizados que refuerzan los modos de unión propuestos.

Esta hipótesis de interacción ha permitido diseñar estructuras simétricas novedosas y muy potentes en los ensayos enzimáticos, que avalan el modelo de unión propuesto, y que se han comportado además como agentes leishmanicidas potentes y con baja toxicidad, situándose al nivel de los mejores compuestos monoméricos en cultivo celular frente a parásito extracelular. Estos compuestos podrían ser considerados como herramientas químicas interesantes para el estudio de la cavidad central interfacial, no explorada hasta el momento para la unión de ligandos en enzimas del parásito, y cuyo papel o función es desconocido hasta el momento.

En la actualidad se están empleando técnicas de simulación avanzadas (*steered DM* y *Umbrella sampling*) para analizar la evolución temporal del sistema fijando como posible

coordenada de reacción la trayectoria de los compuestos desde el centro activo de la enzima hasta la cavidad hidrófoba central de la interfaz de dimerización, donde en última instancia se produciría la desestabilización del homodímero y la precipitación de la enzima observada tras la incubación con los compuestos.

EXPERIMENTAL

E1. CHEMISTRY PROCEDURES

E1.1. General methods

Experiments dealing with air- and/or water-sensitive reagents/compounds were performed in severe anhydrous environment under argon atmosphere. Hygroscopic species were previously dried under vacuum for 24 hours by using P_2O_5 as drying agent. Anhydrous CH_2Cl_2 was dried by reflux over CaH_2 . EtOH was dried with molecular sieves 4 Å previously activated in the microwave. Anhydrous DMSO or DMF were commercially available. THF was dried by distilling over Na and benzophenone.

Pressured reactions were carried out with Sigma-Aldrich *Ace Glass* flask (50 or 100 mL) supplied with Teflon cap.

Microwave assisted experiments were performed using the Biotage *Initiator 2.0* single-mode cavity instrument from Biotage (Uppsala). Experiments were carried out in sealed microwave process vials utilizing the standard absorbance level (400 W maximum power). Temperature was measured with an IR sensor on the outside of the reaction vessel.

Lyophilisation was carried out dissolving the product in mixtures of CH_3CN/H_2O on a *Telstar 6-80* lyophilizer.

E1.2. Chromatographic methods

Reaction and compound purity monitoring was carried out by:

a) Analytical thin-layer chromatography (TLC) on silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) precoated plates (0.2 mm). Spots were detected under UV light (254 nm/360 nm) and/or by using vanillin-acid spray reagent.

b) High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS) through a Waters 2695 HPLC system equipped with a *photodiode array 2996* coupled to *Micromass ZQ 2000* mass spectrometer (ESI-MS), using a C18 *SunFire* column (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m) and as mobile phase, a gradient from 10% of CH_3CN to 95% of CH_3CN (5% of formic acid 0.1% aqueous) in 10 min.

c) Analytical HPLC a Waters 600 equipped with a C18 *Sunfire* column (4.6 mm x 150 mm, 3.5 μ m) and a selectable wavelength UV detector. Alternatively, an Agilent Technologies *1120 Compact LC* provided by a reverse phase column *ACE 5 C18-300* (4.6 mm x 150 mm, 3.5 μ m) and integrated diode detector *PDA 996* was used. As mobile phase mixtures of A: CH_3CN and B: H_2O (0.05% of TFA) on isocratic or gradient mode with a flow rate of 1 mL/min was used. Detection was performed at 214, 217, 254 or 330 nm depending of the compound nature. The following gradients were used: from 10% of A to 100% of A in 10 min (**Gradient A**) and from 1% of A to 100% of A in 10 min (**Gradient B**).

EXPERIMENTAL

The purity of the final compounds, determined by analytical HPLC, is up to 95% unless otherwise indicated.

Compounds purification was carried out by:

a) High Performance Flash column chromatography (HPFC) on a Biotage *Isolera One* using cartridge of Claricep i-Series, Silica, 40g (40-60 μm , 60Å) for the normal phase chromatography and KP-C18-HS 12g (21 x 55 mm) for the reverse-phase. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ mixtures in a gradient from 0% to 20% of MeOH in 30 minutes, detection at 217 nm and flow rate of 20 ml/min were employed for the normal-phase separation. $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ mixtures in a gradient from 0% to 100% of CH_3CN in 60 minutes and flow rate of 6 mL/min were used for the reverse-phase purifications. Selected detection wavelength depended of the absorbance maximum of each compound.

b) Flash column chromatography (Merck) with Silica gel 60 (230-400 mesh) and hexane, AcOEt, CH_2Cl_2 , MeOH and mixtures of them as eluents.

c) Centrifugal Circular Thin-Layer Chromatography (CCTLC) in a Chromatotron™ (Kiesegel 60 PF₂₅₄ gipshaltig (Merck)), with layer thickness of 1 and 2 mm and flow rate of 2 and 3 mL/min respectively.

d) Semipreparative HPLC purifications were performed with a Waters 2695 HPLC system equipped with a Photodiode Array 2998 coupled to a 3100 Mass Detector mass spectrometer, using a C18 Sunfire column (19 mm x 150 mm), gradient from 0% CH_3CN to 100% of CH_3CN in 70 min at 254 nm and a flow rate was 12 mL/min.

E1.3. Structural elucidation and characterization methods

Mass Spectrum (MS) on Electrospray (ESI) mode was registered in a *Hewlett-Packard 1100SD* in positive mode using MeOH, CH_3CN or even a mixture of them as carrier. High Resolution Mass Spectrum (HMRS) was performed in an *Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF LC-MS* equipped with a liquid chromatograph *HP-1200* (Agilent) coupled to a mass spectrometer with hybrid mass analyzer *Q-TOF 6520*. Usually an error equal or lower than 5 ppm is allowed. In these techniques $[\text{M}+\text{H}]^+$ and $[\text{M}+\text{Na}]^+$ peaks were the most significant signals along with $[\text{M}]$ for triazolium salts and $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ for dimer species.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were recorded in the specified deuterated solvent at room temperature (unless otherwise indicated) on a Varian INNOVA-300 operating at 300 MHz (^1H) and 75 MHz (^{13}C), Varian INNOVA-400 operating at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), Varian MERCURY-400 operating at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C) and a Varian SYSTEM-500 operating at 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C).

Each signal of the ^1H NMR spectrum was described by its chemical shift (δ) in parts per million (ppm), multiplicity s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, sext = sextuplet, sept = septuplet and combination of them and br s = broad

singulet and m = multiplet for not defined signals), coupling constants (J) expressed in Hertz, integral value and structural assignation. Those compounds whose structural complexity required more experiments for complete assignation, homonuclear correlation NMR experiments (^1H , ^1H COSY), heteronuclear correlation experiments (^1H , ^{13}C HSQC and ^1H , ^{13}C HMBC) or 1D NOESY experiment were performed.

Microanalyses were obtained with a LECO *CHNS-932* apparatus. Deviations of the elemental analysis results from the calculated are within $\pm 0.4\%$.

Melting points (M.p) were measured on a *Mettler Toledo M170* apparatus and are uncorrected.

Infrared spectrums (IR) were registered in a *Perkin Elmer Spectrum One* instrument and KBr pellet as sample support.

E1.4. Commercially available products

[1,1'-Biphenyl]-4-carboxaldehyde	ALDRICH
1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI)	ALDRICH
1-(2-Hydroxyethyl)imidazolidin-2-one	FLUOROCHEM
1-Bromo-1,2-diphenylethan-2-one	ALDRICH
1-Bromo-2-phenylethan-2-one	ALDRICH
1-Bromo-2-(<i>p</i> -methoxyphenyl)ethan-2-one	ALFA AESAR
1-Bromo-4-phenylbutan-2-one	FLUOROCHEM
1-Chloro-3-benzylpropan-2-one	FLUOROCHEM
1-Chloro-3-phenylpropan-2-one	FLUOROCHEM
1-Hexyne	ALDRICH
1H-Imidazol-2-carboxaldehyde	ALFA AESAR
1-(Triphenylphosphoranylidene)-2-propanone	ALDRICH
2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-1-phenylethan-2-one	ALDRICH
2,3-Dihydrobenzofuran-5-carbaldehyde	ABCR
2-(4-Phenyloxyphenyl)-1-phenylethan-2-one	ABCR
2-Naphthaldehyde	ALDRICH
4-(2-Hydroxyethyl)piperidine-1-carboxylate	FLUOROCHEM
4,4-Dimethylpentan-2-one	ALFA AESAR
4,7-Dimethoxy-1,10-phenanthroline	ALDRICH
4-Bromo-2-fluorobenzonitrile	FLUOROCHEM
4-Bromo-2-methoxybenzonitrile	FLUOROCHEM
4-Iodo-2-fluorobenzonitrile	ALFA AESAR
4-Methylpentan-2-one	ALFA AESAR
4-Phenoxybenzaldehyde	ABCR

EXPERIMENTAL

5-Bromoisophthalic acid	FLUOROCHEM
5-Hexyn-1-ol	ALDRICH
5-Methyl-1,3-benzenedicarboxylic acid	FLUOROCHEM
NH ₃ (NH ₃)	SCHARLAU
Ammonium chloride aqueous solution (NH ₄ Cl)	PANREAC
Ammonium sulfide 20% aq (NH ₄) ₂ S	ALDRICH
Benzophenone	SCHARLAU
Benzyl 4-pentynylcarbamate	ALDRICH
Benzyl 5-hexynylcarbamate	CHEMSPACE
Bromo solution (Br ₂)	ALDRICH
Calcium Hydride (CaH ₂)	ALDRICH
Cesium carbonate (Cs ₂ CO ₃)	ALDRICH
Copper (I) iodide (CuI)	ALDRICH
Copper (I) oxide (Cu ₂ O)	ALDRICH
Copper (II) sulfate pentahydrate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	ALDRICH
Deuterated chloroform (CDCl ₃)	ALDRICH
Deuterated dimethylsulfoxide (DMSO-d ₆)	EURISOTOP
Deuterated MeOH (CD ₃ OD)	EURISOTOP
Deuterium oxide (D ₂ O)	EURISOTOP
Diacetyl benzene	FLUOROCHEM
Dibenzofuran-2-carboxaldehyde	ALDRICH
Di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate (Boc ₂ O)	ALDRICH
Ethyl malonate monoamide	ALFA AESAR
Hydrochloric acid 0.1N, 1N (HCl)	VWR
Isophthalic acid	FLUOROCHEM
Isopropyl chloroacetate	ALFA AESAR
L-Proline (L-Pro)	ALDRICH
Methyl iodide (MeI)	ALDRICH
Methylmagnesium iodide solution 3M in diethyl ether	ALDRICH
Methyl trifluoromethanesulfonate (MeTfo)	ALDRICH
N-bromosuccinimide (NBS)	ALDRICH
N,N-Dimethylglycine	ALFA AESAR
N, O-Dimethylhydroxylamine hydrochloride	ALFA AESAR
<i>o</i> -Anisaldehyde	ALDRICH
Palladium on carbon 10% (Pd/C)	ALDRICH
Phenylboronic acid	ALDRICH
Phosphorus (V) oxide (P ₂ O ₅)	PANREAC

Potassium <i>bis</i> (trimethylsilyl)amide solution 0.5M in toluene (KHMDS)	ALDRICH
Potassium carbonate (K_2CO_3)	PANREAC
<i>p</i> -Toluenesulfonic acid (<i>p</i> -TosOH)	ALDRICH
Quinoline-6-carbaldehyde	ALDRICH
Sodium azide (NaN_3)	ALDRICH
Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	PANREAC
Sodium borohydride ($NaBH_4$)	ALDRICH
Sodium chloride (NaCl)	PANREAC
Sodium hydroxide pellets (NaOH)	PANREAC
Sodium-L-ascorbate	ALDRICH
Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4)	FISHER
<i>Tert</i> -butyl 2-aminoethyl carbamate	ALDRICH
<i>Tert</i> -butyl 5-hexynylcarbamate	CHEMSPACE
Triethylamine (Et_3N)	ALDRICH
Trifluoroacetic acid (TFA)	FLUOROCHEM
Trimethyloxonium tetrafluoroborate (Me_3OBF_4)	ALDRICH
Triphenylphosphine (PPh_3)	ALDRICH

EXPERIMENTAL

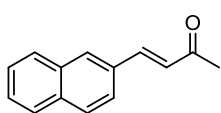
E1.5. Synthesis and characterization of α -bromoketone intermediates

E1.5.1. Synthesis of non-commercially available α,β -unsaturated methylketones

- General procedure for the synthesis of α,β -unsaturated methylketones by aldol condensation¹

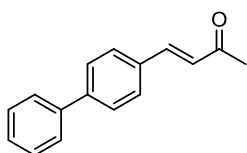
To a solution of the corresponding aldehyde (1 eq) in MeOH, acetone (10 eq) and NaOH 10% aq (10 eq) were successively added. Reaction was stirred at room temperature for 2 h observing the appearance of a colour precipitate. Solid was filtered, washed with H₂O and purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 100:5) to afford the desired α,β -unsaturated derivatives.

(E)-4-(Naphthalen-2-yl)but-3-en-2-one (1.19)



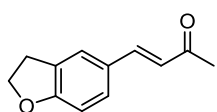
Following the general aldol condensation procedure, commercially available 2-naphthalenecarboxaldehyde (1 g, 6.4 mmol) was reacted with acetone (4.74 mL, 64 mmol) in MeOH (15 mL) in the presence of NaOH 10% aq (25.6 mL, 64 mmol) as base. The final residue after the work up, was purified by flash column chromatography to provide 1.01 g (80%) of a yellow solid identified as **(1.19)**¹. **M.p:** 87-91 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.96 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.90 - 7.82 (m, 3H, Ar), 7.74 - 7.63 (m, 2H, Ar), 7.55 - 7.40 (m, 2H, Ar), 6.84 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, CH=CHCO), 2.43 (s, 3H, CH₃).

(E)-4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)but-3-en-2-one (1.20)



Following the general procedure for the aldol condensation, [1,1'-biphenyl]-4-carboxaldehyde (1 g, 5.49 mmol) was reacted with acetone (4.06 mL, 54.9 mmol) and NaOH 10% aq (22 mL, 45.9 mmol) in MeOH (15 mL) at room temperature for 3 h. The reaction mixture was worked up and purified by flash column chromatography to yield 1.07 g (88%) of a yellow solid characterized as **(1.20)**². **M.p:** 127-139 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.67 - 7.60 (m, 6H, Ar), 7.56 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, CH=CHCO), 7.46 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.45 - 7.31 (m, 1H, Ar), 6.76 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, CH=CHCO), 2.40 (s, 3H, CH₃).

(E)-4-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-yl)but-3-en-2-one (2.62)



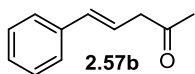
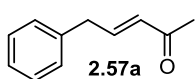
According to the general procedure of the aldol condensation, 2,3-dihydrobenzofuran-5-carbaldehyde (1 g, 6.73 mmol), acetone (4.98 mL, 67.3 mmol) and NaOH 10% aq (27 mL, 67.3 mmol) were reacted. After working up, crude was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 80:20) to provide 811 mg (64%) of a white solid identified as **(2.62)**³. **M.p:** 105-106 °C; ¹H NMR (CDCl₃,

400 MHz) δ (ppm): 7.36 (d, J = 16.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 7.31 (s, 1H, Ar), 7.20 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H, Ar), 6.68 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 6.47 (d, J = 16.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 4.51 (t, J = 8.7 Hz, 2H, OCH_2), 3.12 (t, J = 8.7 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 2.24 (s, 3H, CH_3).

• **General procedure for the synthesis of α,β -unsaturated methylketones by Wittig reaction⁴**

A solution of the corresponding aryl- or alkylaldehyde (1 eq) and 1-(triphenylphosphoranylidene)-2-propanone or 1-(triphenylphosphoranylidene)-3-phenylpropan-2-one (0.9 eq) in CHCl_3 (40 mL) was heated to 60 °C for 4 h. After this time, solvent was evaporated and the residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt 90:10) to obtain the corresponding α,β -unsaturated compounds.

(*E*)-5-Phenylpent-3-en-2-one (2.57a) and (*E*)-5-phenylpent-4-en-2-one (2.57b)

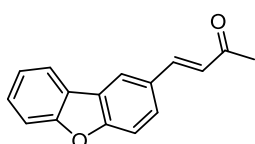


Following the general Wittig procedure, 1-(triphenylphosphoranylidene)-2-propanone (2.87 g, 9.02 mmol) dissolved in CHCl_3 (45 mL) and phenylacetaldehyde (1.17 mL, 9.02 mmol) were reacted at reflux for 4 h. The reaction mixture was worked up and purified by flash column chromatography yielding 1.24 g of an unsolvable 75:25 regioisomer mixture

of (**2.57a**)⁵ and (**2.57b**)⁶ (calculated by ¹H NMR).

¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.41 - 7.01 (m, 7H, $\text{Ar}^{a,b}$), 7.00 (dt, J = 15.9, 1.5 Hz, 0.3H, $\text{PhCH}^b=\text{CH}$), 6.85 (dt, J = 15.9, 7.1 Hz, 0.3H, $\text{PhCH}=\text{CH}^b$), 6.83 (dt, J = 15.9, 6.8 Hz, 1H, $\text{CH}^a=\text{CHCO}$), 6.00 (dt, J = 15.9, 1.6 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}^a\text{CO}$), 3.46 (dd, J = 6.8, 1.6 Hz, 2H, CH_2^a), 3.25 (dd, J = 7.1, 1.3 Hz, 0.5H, CH_2^b), 2.16 (s, 3H, CH_3^a), 2.13 (s, 0.7H, CH_3^b).

(*E*)-4-(Dibenzo[*b,d*]furan-2-yl)but-3-en-2-one (2.63)

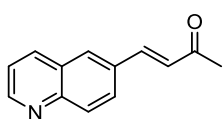


Following the general Wittig procedure, 1-(triphenylphosphoranylidene)-2-propanone (1.06 g, 3.31 mmol) dissolved in CHCl_3 (45 mL) and dibenzofuran-2-carboxaldehyde (500 mg, 2.55 mmol) were reacted. The reaction mixture was worked up

and purified by flash column chromatography yielding 1.09 g (90%) of a white solid identified as (**2.63**). **M.p:** 141-142 °C; **¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm):** 7.93 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.80 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.57 - 7.32 (m, 5H, Ar, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 7.25 (td, J = 7.5, 2.1 Hz, 1H, Ar), 6.64 (d, J = 16.2 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 2.29 (s, 3H, CH_3); **¹³C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm):** 198.2 (CO), 157.5 (OC_{Ar}), 156.7 (OC_{Ar}), 143.5 ($\text{ArCH}=\text{CH}$), 129.4 (C_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.5 ($\text{ArCH}=\text{CH}$), 126.3 (CH_{Ar}), 125.1 (C_{Ar}), 123.6 (C_{Ar}), 123.2 (CH_{Ar}), 120.8 (CH_{Ar}), 120.8 (CH_{Ar}), 112.2 (CH_{Ar}), 111.9 (CH_{Ar}), 27.6 (CH_3); **MS (ESI, positive mode) m/z :** 237.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

EXPERIMENTAL

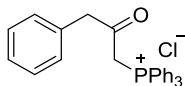
(*E*)-4-(quinolin-6-yl)but-3-en-2-one (**2.64**)



Following the general procedure G, 1-(triphenylphosphoranylidene)-2-propanone (563 mg, 1.77 mmol) dissolved in CHCl_3 (45 mL) and quinoline-6-carbaldehyde (250 mg, 1.59 mmol) were reacted at reflux for 6h. The reaction mixture was worked up and purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 50:50) yielding 1.70 g of an unsolvable mixture of the starting ylide and the desired product (**2.64**). The mixture was used without further purification in the next reaction.

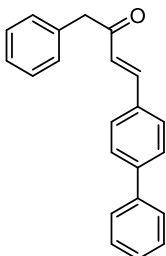
E1.5.2. Synthesis of non-commercially available disubstituted ketones and diketones

Phosphonium (2-oxo-3-phenylpropyl)triphenyl-chloride (**3.19**)⁷

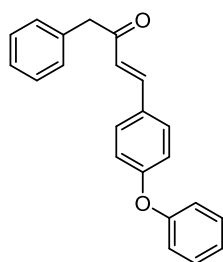


A pressure flash charged with 1-chloro-3-phenylpropan-2-one (250 mg, 1.48 mmol) and triphenylphosphine (583 mg, 2.22 mmol) dissolved in anhydrous toluene (8 mL) and under argon atmosphere, was heated to 110 °C for 6 h. After cooling to room temperature, a white solid was filtered and washed with cooled diethyl ether (3 x 10 mL) to provide 498 mg (78%) of a white solid characterized as (**3.19**)⁸. **M.p:** 200-202 °C; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 7.93 - 7.64 (m, 15H, Ar), 7.31 - 7.20 (m, 3H, Ar), 7.12 (d, J = 6.7 Hz, 2H, Ar), 5.91 (d, J = 12.7 Hz, 2H, Ar), 4.14 (s, 2H, CH_2CO).

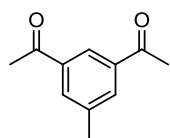
(*E*)-4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-1-phenylbut-3-en-2-one (**3.20**)⁷



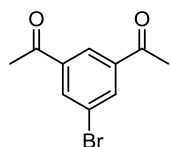
Phosphonium salt (**3.19**) (250 mg, 0.58 mmol) and KOH (130 mg, 2.37 mmol), were diluted with toluene (15 mL) in a pressure flask and then, reaction mixture was heated to 110 °C over stirring for 3 h to obtain the stabilized ylide. After cooling to room temperature, [1,1'-biphenyl]-4-carboxaldehyde (158 mg, 0.87 mmol) was dropwise added to the mixture. Reaction was stirred at 110 °C for 3 h, cooled and concentrated under reduced pressure. Residue was dissolved in AcOEt (30 mL), washed with H_2O (2 x 30 mL) and brine solution (1 x 30 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and evaporated to dryness. Residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 95:5) providing 107 mg (62%) of a white solid identified as (**3.20**). **M.p:** 121-126 °C; ¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.59 (d, J = 16.1 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 7.56 - 7.48 (m, 6H, Ar), 7.37 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.34 - 7.25 (m, 3H, Ar), 7.24 - 7.15 (m, 3H, Ar), 6.74 (d, J = 16.0 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 3.88 (s, 2H, CH_2CO); ¹³C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 197.4 (CO), 143.5 (Ar $\text{CH}=\text{CH}$), 143.1 (C_{Ar}), 140.2 (CH_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 133.5 (C_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 127.7 (Ar $\text{CH}=\text{CH}$), 127.2 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 125.1 (CH_{Ar}), 48.6 (CH_2CO); **MS (ESI, positive mode) m/z:** 321.0 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 299.3 [$\text{M}+\text{H}$]⁺

(E)-4-(4-phenyloxyphenyl)-1-phenylbut-3-en-2-one (3.21)

Following the same synthetic procedure used for (**1**), phosphonium salt (**1**) (700 mg, 1.62 mmol), KOH (728 mg, 13 mmol), and 4-phenoxybenzaldehyde (0.34 mL, 1.95 mmol), were charged in a pressure flask and reacted in toluene (20 mL) as specified. After working up, residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 95:5) yielding 241 mg (47%) of a white solid identified as (**3.21**). **M.p**: 95–97 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.51 (d, J = 16.0 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 7.47 – 7.33 (m, 2H, Ar), 7.30 – 7.21 (m, 4H, Ar), 7.19 – 7.13 (m, 3H, Ar), 7.06 (tt, J = 7.4, 1.1 Hz, 1H, Ar), 6.97 – 6.90 (m, 2H, Ar), 6.89 – 6.83 (m, 2H, Ar), 6.60 (d, J = 16.0 Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHCO}$), 3.83 (s, 2H, CH_2CO); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 197.3 (CO), 159.9 (OC_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 142.8 ($\text{ArCH}=\text{CH}$), 134.7 (C_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.1 ($\text{ArCH}=\text{CH}$), 124.3 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 119.8 (CH_{Ar}), 118.5 (CH_{Ar}), 48.5 (CH_2CO); **MS (ESI, positive mode)** m/z : 337.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 315.0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

1-(3-acetyl-5-methylphenyl)ethan-1-one (3.40)⁹

1,1'-carbonyldiimidazole (CDI) (135 mg, 1.39 mmol) was added to a solution of isophthalic acid (100 mg, 0.56 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) and the reaction was stirred at room temperature for 30 minutes. Then, N,O-dimethylhydroxylamine hydrochloride (216 mg, 1.33 mmol) was added and the reaction was stirred at room temperature for 4 h. Finally, the reaction mixture was washed with H_2O (1 x 15 mL) and brine (1 x 15 mL), dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The oily residue was dissolved in anhydrous THF (10 mL) and subsequently, methylmagnesium iodide solution 3M in diethyl ether (0.74 mL, 2.22 mmol) was added dropwise to the mixture at 0 °C observing the appearance of a white solid. The reaction was allowed to reach room temperature overnight and was concentrated to dryness. The residue was dissolved in AcOEt (40 mL), washed with H_2O (2 x 25 mL) and brine (1 x 25 mL), dried (Na_2SO_4) and evaporated. The final residue was purified by CCTLC in the Cromatotron (hexane/AcOEt, 80:20) to yield 98 mg (32%) of a colourless oil identified as (**3.40**)¹⁰. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 8.31 (t, J = 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.96 – 7.94 (m, 2H, Ar), 2.64 (s, 6H, COCH_3), 2.47 (s, 3H, PhCH_3).

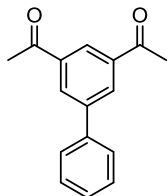
1-(3-acetyl-5-bromophenyl)ethan-1-one (3.41)

Following the synthetic procedure described for (**1**), 5-bromoisophthalic acid (1 g, 4.08 mmol), 1,1'-carbonyldiimidazole (995 mg, 10.2 mmol), N,O-dimethylhydroxylamine (1.59 g, 9.79 mmol) and MeMgI 3M solution in Et_2O

EXPERIMENTAL

(5.4 mL, 16.3 mmol) were used to obtain after working up and without purification, 415 mg (42%) of a yellow solid characterized as **(3.41)**⁹. **M.p:** 72-77 °C; **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm):** 8.38 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, Ar), 8.22 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, Ar), 2.62 (s, 6H, COCH₃).

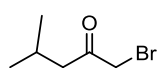
1-(3-acetyl-[5,1'-biphenyl])ethan-1-one (**3.42**)¹¹



A mixture of Pd(OAc)₂ (9.3 mg, 0.04 mmol) and K₂CO₃ (952 mg, 6.88 mmol) diluted in H₂O (10 mL) was heated to 40 °C for 30 minutes. After cooling to room temperature, aryl halide **(3.41)** (332 mg, 1.38 mmol), and phenylboronic acid 95% (252 mg, 2.07 mmol) dissolved in dioxane were subsequently added to reaction mixture that becomes dark instantly. After stirring overnight, crude was filtered over PTFE membrane filters and concentrated under reduced pressure. Wet crude was diluted with H₂O (50 mL) and extracted with AcOEt (3 x 30 mL). Organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered, evaporated to dryness and the residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 80:20) affording 215 mg (55%) of a white solid identified as **(3.42)**. **M.p:** 92-93 °C; **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm):** 8.23 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, Ar), 8.11 (d, *J* = 1.7 Hz, 2H, Ar), 7.45 - 7.33 (m, 2H, Ar), 7.29 - 7.21 (m, 2H, Ar), 7.17 (tt, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1H, Ar), 2.46 (s, 6H, COCH₃); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm):** 197.4 (CO), 142.5 (C_{Ar}), 139.3 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 26.9 (COCH₃); **MS (ESI, positive mode) m/z:** 239.0 [M+H]⁺

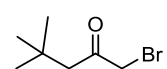
E1.5.3. Bromination of methylketones intermediates

1-bromo-4-methylpentan-2-one (**1.15**)¹²



To a stirring solution of commercially available 4-methylpentan-2-one (1 g, 9.98 mmol) in MeOH (20 mL) was added dropwise a solution of Br₂ (0.51 mL, 9.98 mmol) at 0 °C. Then, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h. After quenching with water (20 mL), the aqueous phase was extracted with Et₂O (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered and carefully concentrated to give 1.79 g of the corresponding α-bromo methyl ketone **(1.15)**¹³ intermediate as a tear colorless oil in quantitative yields. **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm):** 3.85 (s, 2H, CH₂Br), 2.51 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂-¹Pr), 2.16 (sept, 1H, *J* = 6.7 Hz, (CH₃)₂CH), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH₃).

1-bromo-4,4-dimethylpentan-2-one (**1.18**)



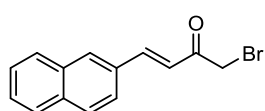
Following the procedure described for compound **(1.15)**, 4,4-dimethylpentan-2-one (1 g, 8.75 mmol) in MeOH (15 mL), was treated with a solution of Br₂ (0.45 mL, 8.75 mmol) for 3 h at room temperature. After the work up process and without further

purification, 1.69 g of a tear colourless oil identified as **(1.18)**¹⁴ was obtained in quantitative yield. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 3.86 (s, 2H, CH₂Br), 2.52 (s, CH₂-^tBu), 1.03 (s, 9H, CH₃).

• **General procedure for the bromination of α -methylketones with N-bromosuccinimide (NBS)**^{1,15}

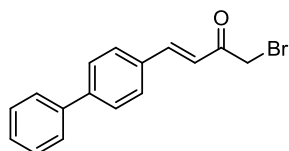
To a solution of α -methylketone (1 eq) in CH₃CN or THF, *p*-toluenesulfonic acid (1.3 - 4.5 eq) and N-bromosuccinimide (1.3 - 4.5 eq) were successively added at -78 °C or room temperature for 6 h/overnight. After quench with H₂O (30 mL), reaction mixture was carefully concentrated under reduced pressure without heating. The crude was dissolved in AcOEt (30 mL), washed with H₂O (3 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was evaporated. The final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 100:5) to give the desired α -bromoketone intermediates.

(E)-1-bromo-4-(naphthalen-2-yl)but-3-en-2-one (1.21)

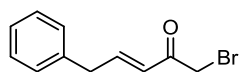


Following the general bromination procedure, to a solution of the α,β -unsaturated intermediate **(1.19)** (475 mg, 2.42 mmol) in CH₃CN (70 mL), *p*-toluenesulfonic acid (598 mg, 3.15 mmol) and NBS (600 mg, 3.15 mmol) were successively added. A colour change from yellow to orange was observed during the reaction. After stirring at room temperature for 6 h, crude was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography to yield 306 mg (48%) of a white solid identified as **(1.21)**¹. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.94 - 7.83 (m, 4H, Ar, CH=CHCO), 7.71 (dd, *J* = 8.5, 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.66 - 7.49 (m, 2H, Ar), 7.07 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH=CHCO), 4.12 (s, 2H, CH₂Br).

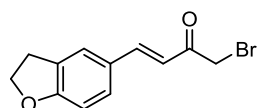
(E)-4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-bromobut-3-en-2-one (1.22)



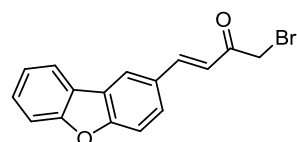
Following the general bromination procedure, α,β -unsaturated intermediate **(1.20)** (198 mg, 0.89 mmol), *p*-toluenesulfonic acid (238 mg, 1.34 mmol) and NBS (255 mg, 1.34 mmol) were dissolved in CH₃CN (40 mL) and the mixture was stirred for 6 h at room temperature. The crude was worked up and purified by flash column chromatography affording 147 mg (55%) of a white solid characterized as **(1.22)**¹⁶. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.74 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CHCO), 7.67 - 7.55 (m, 6H, Ar), 7.52 - 7.43 (m, 2H, Ar), 7.41 - 7.32 (m, 1H, Ar), 6.99 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CHCO), 4.10 (s, 2H, CH₂Br).

(E)-1-bromo-5-phenylpent-3-en-2-one (2.58)

Following the general bromination procedure, *p*-toluenesulfonic acid (890 mg, 4.68 mmol) and N-bromosuccinimide (833 mg, 4.68 mmol) were successively added to a solution of the methylketone mixture **(2.57a and b)** (500 mg, 3.12 mmol) in THF (15 mL) at -78 °C. After 6 h, reaction mixture was allowed to reach room temperature and stirred overnight. Crude was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography to obtain 130 mg (17%) of a colourless oil identified as **(2.58)**. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.37 - 7.31 (m, 2H, Ar), 7.29 - 7.23 (m, 1H, Ar), 7.20 - 7.16 (m, 2H, Ar), 7.12 (dt, *J* = 15.7, 6.8 Hz, 1H, CH=CHCO), 6.28 (dt, *J* = 15.8, 1.6 Hz, 1H, CH=CHCO), 3.98 (s, 2H, CH₂Br), 3.59 (dd, *J* = 7.0, 1.7 Hz, 2H, PhCH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 191.1 (CO), 148.7 (CH₂CH=CH), 137.3 (C_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 127.1 (CH₂CH=CH), 39.0 (Ar-CH₂), 32.7 (CH₂Br).

(E)-1-bromo-4-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)but-3-en-2-one (2.59)

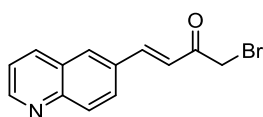
Following the general bromination procedure, *p*-toluenesulfonic acid (380 mg, 2.00 mmol) and NBS (355 mg, 2.00 mmol) were successively added to a solution of methylketone **(2.62)** (250 mg, 1.33 mmol) in THF (15 mL) at -78 °C. After 6 h, reaction mixture was allowed to reach room temperature overnight. Crude was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography to obtain 107 mg (30%) of a white solid identified as **(2.59)**. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.65 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH=CHCO), 7.46 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.36 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, Ar), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar), 6.64 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, CH=CHCO), 4.64 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, OCH₂), 4.05 (s, 2H, CH₂Br), 3.24 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 191.1 (CO), 163.2 (OC_{Ar}), 145.8 (ArCH=CH), 130.7 (CH_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 126.9 (C_{Ar}), 125.2 (ArCH=CH), 119.3 (CH_{Ar}), 110.0 (CH_{Ar}), 72.2 (OCH₂), 33.3 (CH₂Br), 29.3 (OCH₂CH₂); MS (ESI, positive mode) *m/z*: 289.0 [M+Na]⁺, 267.0 [M+H]⁺, both with a Br isotopic pattern.

(E)-1-bromo-4-(dibenzo[*b,d*]furan-2-yl)but-3-en-2-one (2.60)

Following the general bromination procedure, *p*-toluenesulfonic acid (161 mg, 0.85 mmol) and N-bromosuccinimide (151 mg, 0.85 mmol) were successively added to a solution of methylketone **(2.63)** (200 mg, 0.85 mmol) in THF (15 mL) at -78 °C. After 6 h, reaction mixture was allowed to reach room temperature and stirred overnight. Crude was worked up and the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/AcOEt, 93:7) to obtain 75 mg (28%) of a white solid identified as **(2.60)**. *M.p.*: 143-145 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.17 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.98 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.87 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CHCO),

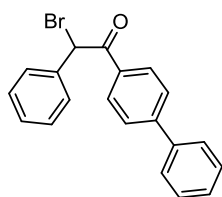
7.70 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H, Ar), 7.62 - 7.57 (m, 2H, Ar), 7.51 (td, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, Ar), 7.39 (td, $J = 7.6, 1.0$ Hz, 1H, Ar), 7.02 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, CH=CHCO), 4.12 (s, 2H, CH₂Br); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 191.0 (CO), 158.0 (OC_{Ar}), 156.9 (OC_{Ar}), 145.7 (ArCH=CH), 143.3 (CH_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (ArCH=CH), 125.1 (C_{Ar}), 123.6 (C_{Ar}), 123.4 (CH_{Ar}), 121.4 (CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 33.3 (CH₂Br); MS (ESI, positive mode) m/z : 329.0 [M+Na]⁺ with a Br isotopic pattern.

(*E*)-1-bromo-4-(quinolin-6-yl)but-3-en-2-one (2.61)



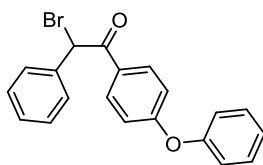
Following the general bromination procedure, crude of reaction (2.64) (1.59 mmol) was brominated by using *p*-toluensulfonic acid (454 mg, 2.39 mmol) and N-bromosuccinimide (425 mg, 2.39 mmol) at room temperature for 6 h. Product (2.61) was not isolated due to stability problems and it was used directly in the next step without further purification.

2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-1-bromo-1-phenylethan-2-one (3.17)



Following the general procedure of bromination, *p*-toluensulfonic acid (173 mg, 0.92 mmol) and N-bromosuccinimide (165 mg, 0.92 mmol) were successively added to a solution of the commercially available 2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-phenylethan-2-one (50 mg, 0.18 mmol) in CH₃CN (15 mL) at room temperature overnight. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/AcOEt, 80:20) to yield 62 mg (98%) of a white solid characterized as (3.17). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.08 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ar), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar), 7.63 - 7.54 (m, 4H, Ar), 7.47 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 7.43 - 7.29 (m, 4H, Ar), 6.43 (s, 1H, BrCHCO).

2-(4-Phenyloxyphenyl)-1-bromo-1-phenylethan-2-one (3.18)

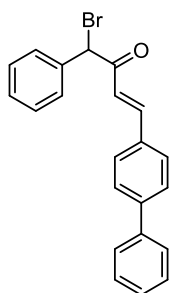


Following the general bromination procedure, the commercially available 2-(4-phenyloxyphenyl)-1-phenylethan-2-one (150 mg, 0.52 mmol), *p*-toluensulfonic acid (297 mg, 1.56 mmol) and N-bromosuccinimide (278 mg, 1.56 mmol) were reacted in CH₃CN (22 mL) at room temperature overnight. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (hexane/CH₂Cl₂, 70:30) to afford 140 mg (73%) of a white solid identified as (3.18). M.p: 116-118 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.97 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ar), 7.53 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 2H, Ar), 7.44 - 7.29 (m, 5H, Ar), 7.22 (tt, $J = 7.3, 1.0$ Hz, 1H, Ar), 7.06 (dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, 2H, Ar), 6.96 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ar), 6.34 (s, 1H, BrCHCO); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 189.7 (CO), 162.7 (OC_{Ar}), 155.1 (OC_{Ar}), 136.2 (C_{Ar}), 131.7 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 129.2

EXPERIMENTAL

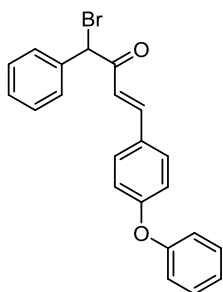
(CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 125.1 (CH_{Ar}), 120.6 (CH_{Ar}), 117.4 (CH_{Ar}), 51.2 (BrCHCO); **MS (ESI, positive mode) m/z**: 389 [M+Na]⁺ with a Br isotopic pattern.

(*E*)-4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-1-bromo-1-phenylbut-3-en-2-one (3.22)



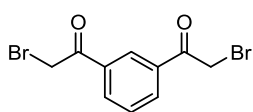
Following the general procedure of bromination, the α,β -unsaturated compound (**3.20**) (200 mg, 0.67 mmol) dissolved in CH₃CN (25 mL), was treated sequentially with *p*-toluensulfonic acid (191 mg, 1.00 mmol) and N-bromosuccinimide (179 mg, 1.00 mmol) at room temperature for 4 h. Reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 90:10) to provide 253 mg (79%) of a white solid characterized as (**3.22**). **M.p.**: 118-120 °C; **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 7.71 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, CH=CHCO), 7.56 - 7.49 (m, 6H, Ar), 7.47 - 7.42 (m, 2H, Ar), 7.41 - 7.34 (m, 2H, Ar), 7.35 - 7.24 (m, 4H, Ar), 6.94 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, CH=CHCO), 5.61 (s, 1H, BrCHCO); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)**: 190.4 (CO), 145.0 (ArCH=CH), 143.9 (C_{Ar}), 140.1 (CH_{Ar}), 135.4 (C_{Ar}), 133.2 (C_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 127.7 (ArCH=CH), 127.2 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 121.4 (CH_{Ar}), 55.5 (BrCHCO).

(*E*)-4-(4-phenyloxyphenyl)-1-phenylbut-3-en-2-one (3.23)



Following the general bromination procedure, the α,β -unsaturated compound (**3.21**) (211 mg, 0.67 mmol), *p*-toluensulfonic acid (140 mg, 0.74 mmol) and N-bromosuccinimide (131 mg, 0.74 mmol) dissolved in CH₃CN (25 mL) were reacted at room temperature for 4 h. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 97:3) to obtain 150 mg (39%) of a yellow oil identified as (**3.23**). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 7.72 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, CH=CHCO), 7.56 - 7.47 (m, 4H, Ar), 7.43 - 7.32 (m, 5H, Ar), 7.18 (tt, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.10 - 7.01 (m, 2H, Ar), 6.97 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar), 6.89 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, CH=CHCO), 5.66 (s, 1H, BrCHCO); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)**: 190.4 (CO), 160.4 (OC_{Ar}), 156.0 (OC_{Ar}), 144.8 (ArCH=CH), 135.5 (C_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (C_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.9 (ArCH=CH), 124.5 (CH_{Ar}), 120.2 (CH_{Ar}), 120.0 (CH_{Ar}), 118.5 (CH_{Ar}), 55.5 (BrCHCO); **MS (ESI, positive mode) m/z**: 417.0 [M+Na]⁺, 393.0 [M+H]⁺ with a Br isotopic pattern.

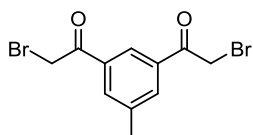
1-(3-(2-Bromo)acetylphenyl)-2-bromoethan-1-one (3.36)¹⁷



Following the general procedure of bromination, diacetyl benzene (250 mg, 1.54 mmol), *p*-toluensulfonic acid (761 mg, 4.00 mmol) and N-bromosuccinimide (713 mg, 4.00 mmol) dissolved in CH₃CN (20 mL), were charged in a flask and stirred overnight at room temperature. Reaction mixture was

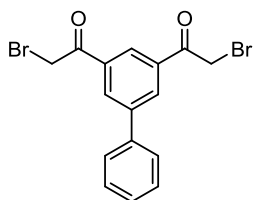
worked up and purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 90:10) to afford 366 mg (74%) of a white solid characterized as **(3.36)**. **M.p.**: 87-88 °C; **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.55 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.20 (dd, *J* = 7.8, 1.8 Hz, 2H, Ar), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 4.78 (s, 4H, BrCH₂CO).

1-(3-(2-Bromo)acetyl-5-methylphenyl)-2-bromoethan-1-one (3.37)



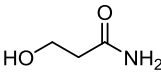
Following the general synthetic procedure of bromination, the previously synthesized diketone **(3.40)** (150 mg, 0.85 mmol), *p*-toluensulfonic acid (370 mg, 1.95 mmol) and N-bromosuccinimide (346 mg, 1.95 mmol), dissolved in CH₃CN (30 mL), were reacted at room temperature overnight. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 90:10) and by CCTLC in the Chromatotron (hexane/AcOEt, 95:5) to provide 180 mg (63%) of a white solid identified as **(3.37)**. **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.36 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H, Ar), 8.02 (dd, *J* = 1.2 Hz, 2H, Ar), 4.47 (s, 4H, BrCH₂CO), 2.51 (s, 3H, CH₃); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)**: 190.7 (CO), 140.1 (C_{Ar}), 134.7 (C_{Ar}), 134.6 (CH_{Ar}), 126.7 (CH_{Ar}), 30.6 (BrCH₂CO), 21.5 (CH₃).

1-(3-(2-Bromo)acetyl-[5,1'-biphenyl])-2-bromoethan-1-one (3.38)

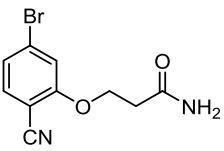


Following the general bromination procedure, the diketone **(3.42)** (95 mg, 0.40 mmol), *p*-toluensulfonic acid (190 mg, 1.00 mmol) and N-bromosuccinimide (177 mg, 1.00 mmol), dissolved in CH₃CN (25 mL), were reacted at room temperature overnight. The final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 95:5) to obtain 33 mg (21%) of a colourless oil identified as **(3.38)**. **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.47 - 8.40 (m, 1H, Ar), 8.38 - 8.30 (m, 2H, Ar), 7.62 - 7.53 (m, 2H, Ar), 7.49 - 7.40 (m, 2H, Ar), 7.39 - 7.32 (m, 1H, Ar), 4.45 (s, 4H, BrCH₂CO).

E1.6. Synthesis and characterization of imidazole-phenyl-thiazoles (Chapter - 1)**3-hydroxypropanamide (1.3)**¹⁸

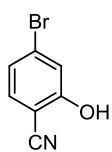
 A solution of ethyl malonate monoamide (2.00 g, 15.3 mmol) in dry EtOH (50 mL) was treated with NaBH₄ (2.13 g, 55.5 mmol) at 0 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, filtered, and quenched with H₂O (25 mL). The solvent was evaporated to dryness and the residue was purified by high performance flash column chromatography (HPFC) in Biotage using silica (CH₂Cl₂ A/MeOH B from 0% of B to 10% of B) to yield 1.14 g (84%) of a colourless oil characterized as **(1.3)**. ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm): 7.24 (br s, 1H, NH₂), 6.75 (br s, 1H, NH₂), 4.53 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, OH), 3.58 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH₂), 2.19 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂CONH₂).

3-(5-Bromo-2-cyanophenoxy)propanamide (1.4)¹⁹

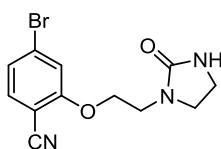
 Alcohol **(1.3)** (313 mg, 3.51 mmol), 4-bromo-2-fluorobenzonitrile (0.639 g, 3.51 mmol) and Cs₂CO₃ (1.26 g, 3.86 mmol) previously dried with P₂O₅, were dissolved in anhydrous DMF (30 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was diluted with AcOEt (50 mL) and then washed with H₂O (3 x 50 mL) and brine (1 x 50 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated to dryness. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) to afford 282 mg (30%) of a white solid identified as **(1.4)**. Mp: 123-124 °C; ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm): 7.68 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, Ar), 7.54 (s, 1H, Ar), 7.47 (br s, 1H, CONH₂), 7.31 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, Ar), 6.97 (br s, 1H, CONH₂), 4.36 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂), 2.57 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm): 171.0 (CONH₂), 160.5 (OC_{Ar}), 134.9 (CH_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 124.2 (CH_{Ar}), 116.5 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 99.9 (C_{Ar}), 65.9 (OCH₂), 34.4 (OCH₂CH₂).

- **General procedure for nucleophilic aromatic substitution (S_N_{Ar})**²⁰

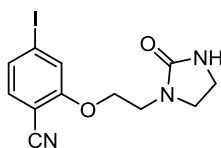
4-halo-2-fluorobenzonitrile (1 eq) was reacted with the corresponding alcohol (1.1 eq) in anhydrous THF, in the presence of a 0.5 M solution of KHMDS (1.2 eq) in toluene (40 mL) at 0 °C. After 5 minutes, the resulting mixture was stirred at room temperature until complete disappearance of starting material and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (40 mL) and was successively washed with HCl aq 0.1N (3 x 15 mL) and brine (3 x 15 mL). The organic phase was dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated to dryness. The final residue was purified by different chromatographic methods as specified below.

4-Bromo-2-hydroxybenzonitrile (1.5)

Following the general procedure of S_NAr , a solution of KHMDS 0.5 M in toluene (2.32 mL, 1.27 mmol) was added dropwise over a solution of alcohol **(1.4)** (104 mg, 1.17 mmol) and 4-bromo-2-fluorobenzonitrile (211 mg, 1.06 mmol) in anhydrous THF (20 mL) at 0 °C. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by HPFC using silica (CH_2Cl_2 A/MeOH B from 0% of B to 7% of B) providing 73 mg (35%) of a white solid identified as **(1.5)**²¹. 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ (ppm): 11.59 (br s, 1H, OH), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Ar), 7.18 (s, 1H, Ar), 7.15 (dd, J = 8.3, 1.0 Hz, 1H, Ar).

4-Bromo-2-(2-(2-oxoimidazolidinyl)ethoxy)benzonitrile (1.6)

Following the general procedure of S_NAr , to a mixture of 1-(2-hydroxyethyl)imidazolidin-2-one (489 mg, 3.58 mmol) and 4-bromo-2-fluorobenzonitrile (650 mg, 3.25 mmol) in anhydrous THF (40 mL), a solution of KHMDS 0.5 M in toluene (7.50 mL, 3.75 mmol) was added dropwise at 0 °C. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 100:1) to obtain 713 mg (71%) of a yellow solid identified as **(1.6)**. **M.p.**: 165-171 °C; **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 3250 (NH-st), 3097 (C_{sp-H} st), 2227 ($C\equiv N$ st), 1685 ($C=O$ st); 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 7.69 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.56 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.32 (dd, J = 8.2, 1.7 Hz, 1H, Ar), 6.42 (br s, 1H, NHCON), 4.26 (t, J = 5.2 Hz, 2H, OCH_2), 3.57 - 3.46 (m, 2H, CH_2CH_2NHCON), 3.44 (t, J = 5.2 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.23 (t, J = 7.8 Hz, 2H, CH_2CH_2NHCON); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 160.5 (OC_{Ar}), 134.9 (CH_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 124.4 (CH_{Ar}), 116.5 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 100.0 (C_{Ar}), 68.7 (OCH_2), 45.9 (CH_2CH_2NHCON), 42.4 (OCH_2CH_2), 37.5 (CH_2CH_2NHCON); **MS (ESI, positive mode) m/z** : 332.0 [$M+Na$]⁺, 310.0 [$M+H$]⁺, with a Br isotopic pattern.

4-Iodo-2-(2-(2-oxoimidazolidinyl)ethoxy)benzonitrile (1.10)

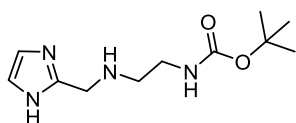
Following the general S_NAr procedure, a solution of KHMDS 0.5 M in toluene (4.86 mL, 2.43 mmol) was added dropwise over a mixture of 1-(2-hydroxyethyl)imidazolidin-2-one (289 mg, 2.23 mmol) and 4-iodo-2-fluorobenzonitrile (500 mg, 2.02 mmol) in anhydrous THF (40 mL) at 0 °C. After stirring overnight at room temperature, the reaction mixture was worked up and purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 100:1) to yield 713 mg (83%) of a yellow solid identified as **(1.10)**. **Mp.**: 160-163 °C; **IR (KBr), ν (cm^{-1})**: 3263 (N-H st), 2225 ($C\equiv N$ st), 1695 ($C=O$ st); 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ (ppm): 7.33 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.26 (s, 1H, Ar), 7.18 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 4.70 (br s, 1H, NHCON), 4.14 (t, J = 4.9 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.71 (dd, J = 9.1, 6.6 Hz, 2H, CH_2CH_2NHCON), 3.58 (t, J = 4.8 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.38 (t, J = 8.0 Hz, 2H,

EXPERIMENTAL

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.8 (NHCON), 160.2 (OC_{Ar}), 134.3 (CH_{Ar}), 130.7 (C_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 116.0 (CH_{Ar}), 101.7 (CN), 101.2 (C_{Ar}), 69.5 (OCH_2), 47.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.2 (OCH_2CH_2), 38.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$); MS (ESI, positive) m/z : 715.0 $[\text{2M}+\text{H}]^+$, 380.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 358.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

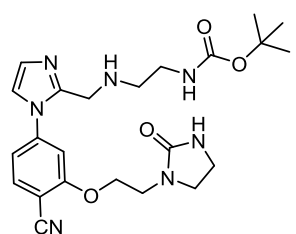
• Synthesis of imidazole intermediates

tert-Butyl (2-((1*H*-imidazol-2-yl)methylamino)ethyl)carbamate (**1.7**)²²



Over a solution of *tert*-butyl 2-aminoethyl carbamate (1.67 g, 10.4 mmol) in MeOH (40 mL), 1*H*-imidazol-2-carboxaldehyde (1.03, 10.4 mmol) was added, and the reaction was stirred at room temperature for 1 h. Then, NaBH_4 (590 mg, 15.6 mmol) was slowly added at 0 °C observing an intense bubbling. After 1 h, the reaction was quenched with a saturated solution of NH_4Cl (60 mL), and basified with NaHCO_3 to pH = 8-9. The solvent was evaporated to dryness and the residue was purified by HPFC in Biotage using silica (CH_2Cl_2 A/MeOH B from 0% of B to 6% of B) to yield 1.97 g (79%) of a white solid identified as (**1.7**). Mp: 157-159 °C; IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3222 (NH-st), 1691 (C=O); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ (ppm): 6.87 (s, 2H, Im), 6.74 (br s, 1H, NH), 3.65 (s, 2H, Im CH_2NH), 2.99 (q, J = 5.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 2.52 (t, J = 6.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.37 (s, 9H, CH_3); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 155.6 (NHCOO), 140.0 (C_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 78.1 (OC), 46.3 (Im CH_2N), 43.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 36.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 28.2 (CH_3); MS (ESI, positive) m/z : 241.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

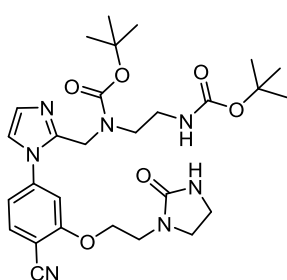
tert-Butyl (2-(((1-(4-cyano-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)amino)ethyl)carbamate (**1.9**)²³



A microwave vial was charged with the iodoarene (**1.10**) (174 mg, 0.49 mmol), substituted imidazol (**1.7**) (234 mg, 0.97 mmol), Cs_2CO_3 (317 mg, 0.97 mmol) and a catalytic amount of *N,N*-dimethylglycine and Cu_2O dissolved in anhydrous DMSO (3 mL) under argon atmosphere. The reaction mixture was heated at 85 °C with microwave assistance three times for 2 h each one. The crude was diluted with H_2O (50 mL), extracted with CH_2Cl_2 (3 x 40 mL), dried with Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:10) affording 176 mg (89%) of a colourless oil identified as (**1.9**). ^1H NMR (CD_3OD , 300 MHz) δ (ppm): 7.80 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.62 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.45 - 7.35 (m, 1H, Ar), 7.30 (dd, J = 8.2 Hz, 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.14 - 7.05 (m, 1H, Ar), 4.34 (t, J = 5.1 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.89 - 3.80 (m, 2H, Im CH_2NH), 3.76 (dd, J = 9.1, 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.63 (t, J = 5.1 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.42 (dd, J = 9.5, 6.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$),

3.15 - 3.10 (m, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 2.70 - 2.60 (m, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1.42 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 162.7 (OC_{Ar}), 158.5 (NHCOO), 147.6 (C_{Ar}), 144.0 (C_{Ar}), 135.9 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 122.6 (CH_{Im}), 122.6 (CH_{Im}), 119.1 (C_{Ar}), 116.6 (CN), 111.3 (CH_{Ar}), 102.5 (C_{Ar}), 80.1 (OC(CH₃)₃), 70.0 (OCH₂), 49.6 (CH₂CH₂NHCON), 48.0 (OCH₂CH₂), 45.7 (ImCH₂N), 43.9 (CH₂CH₂NHBoc), 41.2 (CH₂CH₂NHCON), 39.4 (CH₂CH₂NHBoc), 28.8 (CH₃); HRMS (ESI positive, m/z): calculated for C₂₃H₃₁N₇O₄ 469.2438; found 469.2452 (3.02 ppm).

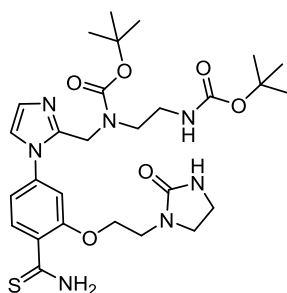
tert-Butyl (2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)((1-(4-cyano-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (1.11)²⁴



Monoprotected imidazol (**1.9**) (250 mg, 0.53 mmol) was treated with Et₃N (0.11 mL, 0.80 mmol) in MeOH (10 mL) during 10 minutes. After proton abstraction, di-*tert*-butyl dicarbonate (0.18 mL, 0.80 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. After consumption of the free amine, crude was concentrated and dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL). The organic layer was washed with H₂O (3 x 10 mL), brine (1 x 15 mL) and then dried

(Na₂SO₄), filtered and evaporated. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:7) to yield 278 mg (92%) of a colourless oil identified as (**1.11**). ¹H NMR (CD₃OD, 300 MHz) δ (ppm): 7.81 - 7.71 (m, 1H, Ar), 7.46 - 7.36 (m, 1H, Ar), 7.32 (s, 1H, Ar), 7.12 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.07 (s, 1H, Ar), 4.75 - 4.65 (m, 2H, ImCH₂N), 4.39 - 4.31 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.76 (dd, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.62 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.42 (dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.15 - 3.00 (m, 4H, CH₂CH₂NHBoc), 1.39 (s, 9H, CH₃), 1.34 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.4 (NHCON), 163.0 (OC_{Ar}), 158.6 (NHCOO), 156.9 (NHCOO), 146.4 (C_{Ar}), 144.1 (C_{Ar}), 136.1 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 123.8 (CH_{Im}), 123.8 (CH_{Im}), 119.9 (C_{Ar}), 117.0 (CN), 112.3 (CH_{Ar}), 103.4 (C_{Ar}), 82.0 (OC(CH₃)₃), 80.4 (OC(CH₃)₃), 70.6 (OCH₂), 48.5 (CH₂CH₂NHCON), 47.5 (OCH₂CH₂), 44.3 (ImCH₂N), 44.0 (CH₂CH₂NHBoc), 39.8 (CH₂CH₂NHCON), 39.5 (CH₂CH₂NHBoc), 29.2 (CH₃), 29.0 (CH₃); HRMS (ESI positive, m/z): calculated for C₂₈H₃₉N₇O₆ 569.2962; found 569.2976 (2.56 ppm).

tert-Butyl (2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)((1-(4-carbamothioyl-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (1.12)²⁰



A solution of benzonitrile (**1.11**) (744 mg, 1.31 mmol) and aqueous (NH₄)₂S 20% (6.5 mL, 91.7 mmol) in DMF (15 mL) was heated at 80 °C for 4 h. After that time, the reaction was allowed to cool to room temperature. The crude was diluted with CH₂Cl₂ (50 mL), washed with HCl 0.1 N (3 x 30 mL), dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column

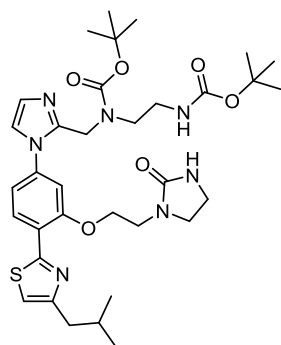
EXPERIMENTAL

chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:7) to obtain 638 mg (82%) of a yellow oil characterized as **(1.12)**. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, 70 °C) δ (ppm): 9.80 (br s, 1H, SCNH₂), 9.23 (br s, 1H, SCNH₂), 8.08 - 7.95 (s, 1H, Ar), 7.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.32 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 7.18 (br s, 1H, NHCON), 7.02 (dd, *J* = 8.3, 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.00 (d, *J* = 2.0, 1H, Ar), 6.14 (br s, 1H, NHBoc), 4.49 (s, 2H, ImCH₂N), 4.24 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.69 - 3.41 (m, 4H, CH₂CH₂NHCON, OCH₂CH₂), 3.34 - 3.18 (m, 4H, CH₂CH₂NHCON, CH₂CH₂NHBoc), 3.23 - 3.06 (m, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1.37 (s, 9H, CH₃), 1.28 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ (ppm): 210.0 (SCNH₂), 166.0 (C_{Ar}), 165.1 (C_{Ar}), 164.8 (C_{Ar}), 156.6 (NHCOO), 156.3 (NHCOO), 145.8 (C_{Ar}), 141.3 (C_{Ar}), 135.7 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 123.4 (CH_{Im}), 123.4 (CH_{Im}), 118.4 (CH_{Ar}), 111.4 (C_{Ar}), 81.6 (OC(CH₃)₃), 80.8 (OC(CH₃)₃), 68.6 (OCH₂), 49.8 (CH₂CH₂NHCON), 46.9 (OCH₂CH₂), 44.0 (ImCH₂N), 39.3 (CH₂CH₂NHBoc), 36.9 (CH₂CH₂NHCON), 30.7 (CH₂CH₂NHBoc), 28.8 (CH₃), 28.6 (CH₃); HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₂₈H₄₁N₇O₆S 603.2839; found 603.2830 (-1.43 ppm).

- General procedure for the Hantzsch thiazole synthesis (Chapter - 1)²⁵

A solution of the corresponding thioamide (1 eq) in ⁱPrOH, was treated with the appropriated α-haloketone precursors (1 - 4 eq). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 4 h in a pressure flask. Then, it was allowed to cool to room temperature and was concentrated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography (eluents are specified in each case).

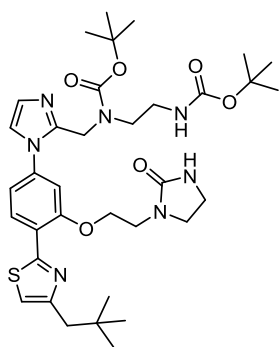
tert-Butyl (2-((tert-butoxycarbonyl)aminoethyl)((1-(4-(4-isobutylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (1.16)



Following the general Hantzsch procedure, the thioamide **(1.12)** (50 mg, 0.08 mmol) was reacted with the α-bromoketone **(1.15)** (30 mg, 0.17 mmol) in ⁱPrOH (10 mL). The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:6) to afford 50 mg (88%) of a colourless oil identified as **(1.16)**. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.41 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar), 7.42 - 7.35 (m, 1H, Ar), 7.33 (s, 1H, Ar), 7.20 (s, 1H, Ar), 7.12 - 7.05 (m, 2H, Ar), 4.76 - 4.52 (m, 2H, ImCH₂N), 4.48 - 4.36 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.74 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.62 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, *J* = 9.0, 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.28 - 3.05 (m, 4H, CH₂CH₂NHBoc), 2.70 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 2.18 - 2.05 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.38 (s, 9H, CH₃), 1.27 (s, 9H, CH₃), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, CH(CH₃)₂); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.0 (NHCON), 162.0 (C_{Ar}), 158.2 (OC_{Ar}), 157.1 (NHCOO), 156.5 (NHCOO), 146.3 (C_{Ar}), 145.9 (C_{Ar}), 139.8 (CH_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Im}), 123.6 (CH_{Im}), 119.1 (CH_{Ar}), 117.2 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 81.5 (OC(CH₃)₃), 79.9 (OC(CH₃)₃), 68.4 (OCH₂), 47.3 (CH₂CH₂NHCON), 46.8 (OCH₂CH₂), 43.8 (CH₂CH₂NHBoc), 41.4 (CH₂CH₂NHBoc), 39.3

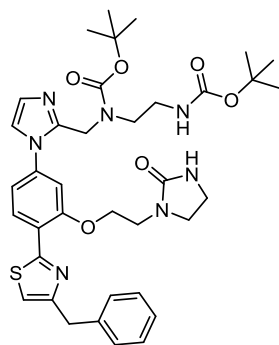
(CH₂CH₂NHCON), 29.9 (ThiazCH₂), 28.8 (CH₃), 28.5 (CH₃), 22.8 ((CH₃)₂); **HRMS (ESI positive, *m/z*):** calculated for C₃₄H₄₉N₇O₆S 683.3465; found 683.3468 (0.37 ppm).

***tert*-Butyl (2-((*tert*-butoxycarbonyl)aminoethyl)((1-(4-(4-neopentylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (1.23)**



Following the general Hantzsch procedure, the thioamide (**1.12**) (70 mg, 0.12 mmol) and the α -bromoketone (**1.18**) (67 mg, 0.35 mmol) in *i*PrOH (15 mL) were reacted. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:6) to provide 60 mg (75%) of a colourless oil identified as (**1.23**). **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 8.42 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar), 7.42 - 7.35 (m, 1H, Ar), 7.33 (s, 1H, Ar), 7.20 (s, 1H, Ar), 7.12 - 7.05 (m, Ar), 4.76 - 4.51 (m, 2H, ImCH₂N), 4.48 - 4.37 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.75 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.63 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.38 (dd, *J* = 8.9, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.28 - 3.03 (m, 4H, CH₂CH₂NHBoc), 2.75 (s, 2H, CH₂C(CH₃)₃), 1.39 (s, 9H, CH₃), 1.26 (s, 9H, CH₃), 0.99 (s, 9H, CH₂C(CH₃)₃); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm):** 166.0 (NHCON), 165.1 (C_{Ar}), 158.2 (C_{Ar}), 157.1 (NHCOO), 156.5 (NHCOO), 155.8 (C_{Ar}), 145.9 (C_{Ar}), 139.8 (CH_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 124.1 (CH_{Im}), 123.6 (CH_{Im}), 119.2 (CH_{Ar}), 118.4 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 81.5 (OC(CH₃)₃), 79.9 (OC(CH₃)₃), 68.3 (OCH₂), 47.3 (CH₂CH₂NHCON), 46.8 (OCH₂CH₂), 45.7 (CH₂CH₂NHBoc), 43.9 (CH₂CH₂NHBoc), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 32.4 (ThiazCH₂C), 30.0 (ThiazCH₂), 28.8 (CH₃), 28.6 (CH₃); **HRMS (ESI positive, *m/z*):** calculated for C₃₅H₅₁N₇O₆S 697.3621; found 697.3644 (3.19 ppm).

***tert*-Butyl ((1-(4-(4-benzylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamate (1.24)**

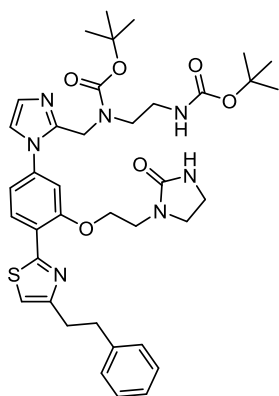


Following the general Hantzsch procedure, the thioamide (**1.12**) (50 mg, 0.08 mmol) was reacted with the commercially available 1-chloro-3-phenylpropan-2-one (56 mg, 0.33 mmol) in *i*PrOH (10 mL). After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:5) affording 74 mg (95%) of a colourless oil identified as (**1.24**). **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 8.39 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, Ar), 7.36 - 7.26 (m, 5H, Ar), 7.24 - 7.16 (m, 1H, Ar), 7.33 (s, 1H, Ar), 7.20 (s, 1H, Ar), 7.12 - 7.05 (m, 2H, Ar), 4.72 - 4.53 (m, 2H, ImCH₂N), 4.45 - 4.38 (m, 2H, OCH₂CH₂), 4.17 (s, 2H, CH₂Ph), 3.72 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.58 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.35 (dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.29 - 3.06 (m, 4H, CH₂CH₂NHBoc), 1.39 (s, 9H, CH₃), 1.25 (s, 9H, CH₃); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm):** 165.0 (NHCON), 162.5 (C_{Ar}), 158.2 (C_{Ar}), 157.1 (NHCOO), 156.9

EXPERIMENTAL

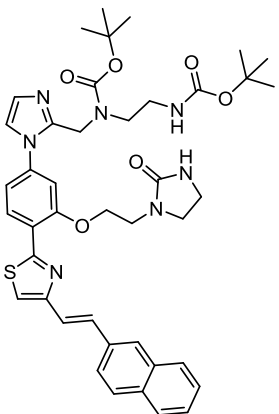
(NHCOO), 156.5 (C_{Ar}), 145.8 (C_{Ar}), 140.9 (C_{Ar}), 140.0 (CH_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Im}), 123.6 (CH_{Im}), 119.1 (CH_{Ar}), 117.6 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 81.5 ($OC(CH_3)_3$), 79.9 ($OC(CH_3)_3$), 68.3 (OCH_2), 47.2 (CH_2CH_2NHCON), 46.8 (OCH_2CH_2), 43.8 (CH_2CH_2NHBoc), 39.2 (CH_2CH_2NHCON), 38.4 (ThiazCH₂), 28.8 (CH_3), 28.5 (CH_3); **HRMS (ESI positive, m/z):** calculated for $C_{33}H_{47}N_7O_6S$ 717.3308; found 717.3343 (4.85 ppm).

***tert*-Butyl (2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)((1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (1.25)**



Following the general Hantzsch procedure, the thioamide (**1.12**) (50 mg, 0.08 mmol) and 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (75 mg, 0.33 mmol) were reacted in *i*PrOH (12 mL). The final residue was purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 100:5) to give 57 mg (94%) of a colourless oil identified as (**1.25**). **1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm):** 8.44 (d, J = 6.8 Hz, 1H, Ar), 7.43 - 7.37 (m, 1H, Ar), 7.33 (s, 1H, Ar), 7.26 - 7.21 (m, 2H, Ar), 7.20 - 7.10 (m, 5H, Ar), 7.08 (s, 1H, Ar), 4.75 - 4.55 (m, 2H, ImCH₂N), 4.47 - 4.41 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.74 (t, J = 4.9 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (t, J = 8.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.38 (dd, J = 9.1, 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.16 - 3.06 (m, 8H, CH₂CH₂NHBoc, CH₂CH₂Ph), 1.39 (s, 9H, CH₃), 1.26 (s, 9H, CH₃); **^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm):** 166.1 (NHCON), 165.0 (C_{Ar}), 158.3 (C_{Ar}), 157.1 (NHCOO), 156.9 (NHCOO), 156.5 (C_{Ar}), 145.9 (C_{Ar}), 142.8 (C_{Ar}), 140.0 (CH_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Im}), 123.6 (CH_{Im}), 119.1 (CH_{Ar}), 117.0 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 81.5 ($OC(CH_3)_3$), 80.0 ($OC(CH_3)_3$), 68.3 (OCH_2), 47.2 (CH_2CH_2NHCON), 46.8 (OCH_2CH_2), 43.8 (CH_2CH_2NHBoc), 39.3 (CH_2CH_2NHCON), 36.7 (ThiazCH₂CH₂), 34.3 (ThiazCH₂CH₂), 28.8 (CH_3), 28.6 (CH_3); **HRMS (ESI positive, m/z):** calculated for $C_{38}H_{49}N_7O_6S$ 731.3465; found 731.3483 (2.42 ppm).

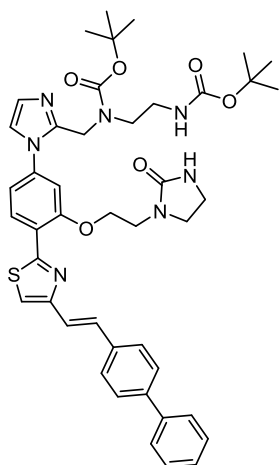
***tert*-Butyl (*E*)-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)((1-(4-(4-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (1.26)**



Following the general Hantzsch procedure, the thioamide (**1.12**) (100 mg, 0.17 mmol) was reacted with the α -bromoketone (**1.21**) (91 mg, 0.33 mmol) in *i*PrOH (20 mL). The final residue after the work up, was purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 100:8) to obtain 90 mg (69%) of a colourless oil identified as (**1.26**). **1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm):** 8.60 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 8.05 (s, 1H, Ar), 7.93 (s, 1H, Ar), 7.90 - 7.77 (m, 4H, Ar), 7.73 (d, J = 16.0 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 7.58 (s, 1H, Ar), 7.49 - 7.32 (m, 5H, Ar, ThiazCH=CH), 7.15 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H, Ar) 7.09 (s, 1H, Ar), 4.78 - 4.52 (m, 2H,

ImCH₂N), 4.49 - 4.42 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.76 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.63 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, *J* = 9.0, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 - 3.04 (m, 4H, CH₂CH₂NHBoc), 1.39 (s, 9H, CH₃), 1.28 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 166.5 (NHCON), 165.3 (C_{Ar}), 162.8 (C_{Ar}), 158.7 (C_{Ar}), 157.7 (NHCOO), 157.0 (NHCOO), 155.1 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 136.5 (C_{Ar}), 135.7 (CH_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 132.7 (C_{Ar}), 131.2 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 123.4 (CH_{Im}), 123.4 (CH_{Im}), 119.1 (CH_{Ar}), 112.1 (C_{Ar}), 81.9 (OC(CH₃)₃), 80.4 (OC(CH₃)₃), 68.7 (OCH₂), 47.2 (OCH₂CH₂), 44.3 (CH₂CH₂NHBoc), 39.7 (CH₂CH₂NHCON), 29.2 (CH₃), 29.0 (CH₃); HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₄₂H₄₉N₇O₆S 779.3465; found 779.3474 (1.20 ppm).

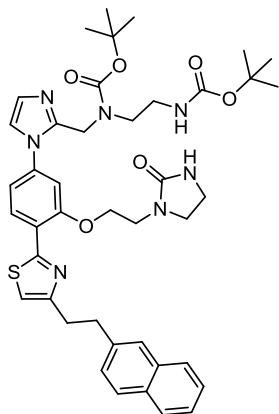
tert-Butyl (E)-((1-(4-(4-(2-((1,1'-biphenyl)-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamate (1.27)



Following the general Hantzsch procedure, the thioamide (**1.12**) (220 mg, 0.36 mmol) and the α-bromoketone (**1.22**) (110 mg, 0.36 mmol) were reacted in ⁱPrOH (25 mL). The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:8) to afford 182 mg (79%) of a colourless oil identified as (**1.27**). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.84 - 7.54 (m, 7H, Ar), 7.48 - 7.52 (m, 2H, Ar), 7.41 - 7.24 (m, 2H, Ar, CH=CH), 7.21 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, CH=CH), 7.15 - 6.90 (m, 3H, Ar), 4.66 - 4.38 (m, 4H, ImCH₂NH, OCH₂CH₂), 3.80 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.46 - 3.33 (m, 4H, CH₂CH₂NHCON, CH₂CH₂NHBoc), 3.27 - 3.19 (m, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1.43 (s, 9H, CH₃),

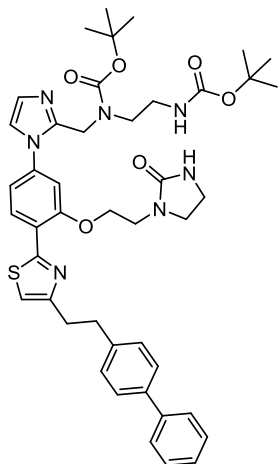
1.37 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 161.0 (C_{Ar}), 156.3 (C_{Ar}), 155.9 (NHCOO), 155.4 (NHCOO), 153.4 (C_{Ar}), 144.9 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 139.0 (CH_{Ar}), 136.2 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 122.6 (CH_{Im}), 121.5 (CH_{Im}), 118.3 (CH_{Ar}), 117.2 (CH_{Ar}), 110.2 (C_{Ar}), 80.5 (OC(CH₃)₃), 78.9 (OC(CH₃)₃), 67.9 (OCH₂), 48.4 (CH₂CH₂NHCON), 46.3 (OCH₂CH₂), 43.2 (CH₂CH₂NHBoc), 39.4 (CH₂CH₂NHCON), 38.4 (CH₂CH₂NHBoc), 28.6 (CH₃), 28.3 (CH₃); HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₄₄H₅₁N₇O₆S 805.3622; found 805.3628 (0.83 ppm).

***tert*-Butyl (2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)((1-(4-(4-(2-(naphthalen-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)carbamate (**1.28**)²⁶**



A solution of (**1.26**) (66 mg, 0.08 mmol) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (10 mL) with Pd/C 10% (catalytic amount) was subjected to hydrogenation (balloon) for 2 h at room temperature. Then, the reaction mixture was filtered over PTFE membrane filters and the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by CCTLC on the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 100:5) to afford 46 mg (70%) of a colourless oil identified as (**1.28**). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.87 - 7.69 (m, 3H), 7.62 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.46 - 6.93 (m, 8H, Ar), 4.72 - 4.52 (m, 2H, ImCH₂N), 4.49 - 4.42 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.71 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.57 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.34 - 3.28 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 - 3.22 (m, 4H, CH₂CH₂NHBoc), 3.19 - 3.06 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 1.38 (s, 9H, CH₃), 1.26 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 166.0 (NHCON), 165.0 (C_{Ar}), 162.1 (C_{Ar}), 158.2 (C_{Ar}), 157.1 (NHCOO), 156.9 (NHCOO), 156.5 (C_{Ar}), 140.3 (C_{Ar}), 139.9 (C_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 123.5 (CH_{Im}), 123.5 (CH_{Im}), 119.1 (CH_{Ar}), 117.1 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 81.5 (OC(CH₃)₃), 79.9 (OC(CH₃)₃), 68.4 (OCH₂), 47.4 (CH₂CH₂NHCON), 46.8 (OCH₂CH₂), 43.8 (CH₂CH₂NHBoc), 39.2 (CH₂CH₂NHCON), 36.8 (ThiazCH₂CH₂), 34.0 (ThiazCH₂CH₂), 28.8 (CH₃), 28.6 (CH₃); HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₄₂H₅₁N₇O₆S 781.3622; found 781.3643 (2.72 ppm).

***tert*-Butyl ((1-(4-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethyl)carbamate (**1.29**)**



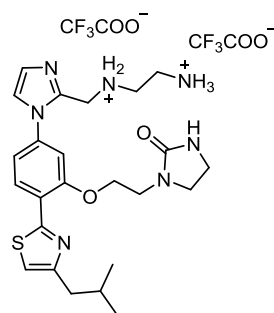
Following the same procedure described for (**1.28**), a solution of (**1.27**) (150 mg, 0.19 mmol) was subjected to hydrogenation on a mixture of THF/MeOH 1:1 (15 mL). After working up, residue was purified by CCTLC on the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 100:5) to provide 85 mg (80%) of a colourless oil identified as (**1.29**). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 80 °C) δ (ppm): 8.39 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.67 - 7.60 (m, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.48 - 7.40 (m, 2H, Ar), 7.38 - 7.29 (m, 6H, Ar), 7.11 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.03 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.54 (br s, 1H, NHBoc), 6.06 (br s, 1H, NCONH), 4.55 (s, 2H, ImCH₂N), 4.42 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.48 (dd, *J* = 8.9, 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.26 (dd, *J* =

8.5, 6.3 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON, CH₂CH₂NHBoc), 3.18 - 3.02 (m, 6H, CH₂CH₂NHBoc, ThiazCH₂CH₂), 1.37 (s, 9H, CH₃), 1.26 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, 80°C) δ (ppm): 161.5 (NHCON), 159.3 (C_{Ar}), 155.0 (NHCOO), 154.9 (NHCOO), 154.0 (C_{Ar}), 144.1 (C_{Ar}), 140.3 (C_{Ar}), 139.8 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 137.5 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 121.6 (CH_{Im}), 121.2 (CH_{Im}), 117.5 (CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 110.3 (C_{Ar}), 78.5 (OC(CH₃)₃), 77.1 (OC(CH₃)₃), 67.2 (OCH₂), 46.1 (CH₂CH₂NHCON), 44.9 (OCH₂CH₂), 42.8 (ImCH₂N), 42.2 (CH₂CH₂NHBoc), 38.0 (CH₂CH₂NHCON), 37.1 (CH₂CH₂NHBoc), 33.9 (ThiazCH₂CH₂), 32.0 (ThiazCH₂CH₂), 27.8 (CH₃), 27.5 (CH₃); HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₄₄H₅₃N₇O₆S 807.3778; found 807.3804 (3.2 ppm).

• General procedure for the Boc deprotection²⁵

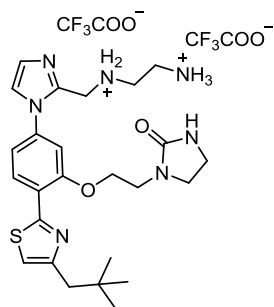
To a solution of the Boc protected precursors (1 eq) in CH₂Cl₂ (10 ml), trifluoroacetic acid (TFA) (40 eq) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, volatiles were removed and the residue was co-evaporated with mixtures of CH₂Cl₂ and MeOH (5 x 5 ml) to obtain the desired products quantitatively. To ensure the removal of volatile agents, final products were dissolved in 1:1 mixtures of H₂O/CH₃CN and lyophilized.

***N*¹-((1-(4-(4-isobutylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)ethane-1,2-diaminium 2,2,2-trifluoroacetate (1.17)**



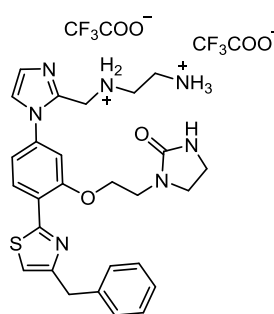
Following the general Boc deprotection procedure, a solution of (**1.16**) (41 mg, 0.06 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was treated with TFA (0.5 mL). After the work up, 42 mg (>99%) of a colourless oil, identified as (**1.17**), were obtained. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.33 - 7.26 (m, 2H, Ar), 4.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 4.22 (s, 2H, ImCH₂NH), 3.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.63 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.38 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.08 (dd, *J* = 6.8, 4.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 3.00 (dd, *J* = 6.7, 4.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 2.72 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 2.20 - 2.06 (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH₂CH(CH₃)₂); ¹³C-NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 161.2 (OC_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 147.3 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 125.6 (CH_{Im}), 124.8 (CH_{Im}), 121.9 (CH_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 117.9 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 68.2 (OCH₂), 46.9 (ImCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 44.3 (CH₂CH₂NH₃⁺), 43.5 (OCH₂CH₂), 41.4 (ThiazCH₂), 39.6 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 29.9 (CH(CH₃)₃), 22.7 (CH₃); HPLC (*Gradient A*, *Agilent*): *t_r* = 3.4 min; HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₂₄H₃₃N₇O₂S 483.2416; found 483.2412 (-0.86 ppm); Elemental analysis: calculated for C₂₈H₃₅F₆N₇O₆S: C. 47.26; H. 4.96; N. 13.78; S. 4.50; Found: C. 47.15; H. 4.83; N. 13.97; S. 4.90.

***N*¹-((1-(4-(4-Neopentylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)ethane-1,2-diaminium 2,2,2-trifluoroacetate (**1.30**)**



Following the general Boc deprotection procedure, (**1.23**) (50 mg, 0.07 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) was treated with TFA (0.5 mL). After the work up, 51 mg (>99%) of a colourless oil, identified as (**1.30**), were obtained. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.78 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.34 - 7.26 (m, 2H, Ar), 4.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 4.24 (s, 2H, ImCH₂NH), 3.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.63 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.38 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.10 (dd, *J* = 6.5, 4.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 3.03 (dd, *J* = 6.6, 4.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 2.77 (s, 2H, CH₂C(CH₃)₃), 1.00 (s, 9H, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 160.4 (OC_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 147.2 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Im}), 124.8 (CH_{Im}), 121.9 (CH_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 68.2 (OCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 45.7 (ThiazCH₂), 44.3 (CH₂CH₂NH₃⁺), 43.5, (OCH₂CH₂) 39.6 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 32.4 (C(CH₃)₃), 30.0 (CH₃); HPLC (Gradient A, Agilent): *t*_r = 3.4 min; HRMS (ESI positive, *m/z*): calculated for C₂₅H₃₅N₇O₂S 497.2573; found 497.2562 (-2.19 ppm); Elemental analysis: calculated for C₂₉H₃₇F₆N₇O₆S: C. 48.00; H. 5.14; N. 13.51; S. 4.42; Found: C. 48.05; H. 4.68; N. 13.77; S. 4.52.

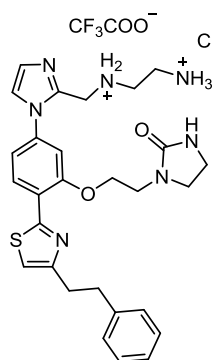
***N*¹-((1-(4-(4-Benzylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)ethane-1,2-diaminium 2,2,2-trifluoroacetate (**1.31**)**



Following the general Boc deprotection procedure, a solution of (**1.24**) (20 mg, 0.03 mmol) in CH₂Cl₂ (7 mL) was treated with TFA (0.4 mL). After working up, 20 mg (>99%) of a colourless oil, identified as (**1.31**), were obtained. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.64 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.40 - 7.25 (m, 5H, Ar), 7.24 - 7.18 (m, 2H, Ar), 4.47 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 4.26 (s, 2H, ImCH₂NH), 4.19 (s, 2H, CH₂Ph), 3.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.59 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.35 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.11 (dd, *J* = 6.2, 4.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 3.06 (dd, *J* = 4.5, 2.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 160.4 (OC_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 146.9 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 125.4 (CH_{Im}), 124.8 (CH_{Im}), 122.0 (CH_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 118.3 (CH_{Ar}), 114.1 (C_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 68.1 (OCH₂), 46.8 (ImCH₂), 46.7 (CH₂CH₂NHCON), 44.2 (CH₂CH₂NH₃⁺), 43.4 (OCH₂CH₂), 39.5 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON),

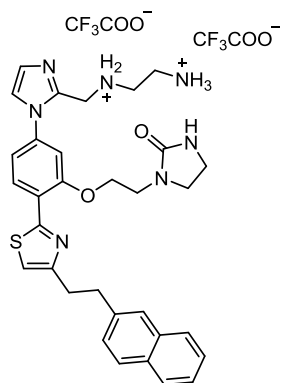
38.4 (ThiazCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 3.8 min; **HRMS (ESI positive, m/z)**: calculated for C₂₇H₃₁N₇O₂S 517.2560; found 517.2560 (-0.09 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₁H₃₃F₆N₇O₆S: C. 49.93; H. 4.46; N. 13.15; S. 4.30; Found: C. 49.75; H. 4.46; N. 15.64; S. 4.70.

***N* -((1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)ethane-1,2-diaminium 2,2,2-trifluoroacetate (1.32)**



Following the general Boc deprotection procedure, **(1.25)** (51 mg, 0.07 mmol) dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) was treated with TFA (0.5 mL). After the work up, 52 mg (>99%) of a colourless oil, identified as **(1.32)**, were obtained. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.55 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.79 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.65 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.49 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.31 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.28 - 7.04 (m, 6H, Ar), 4.49 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 4.23 (s, 2H, ImCH₂NH), 3.75 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.62 (dd, J = 9.1, 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.19 - 3.13 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 3.11 - 3.05 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 3.04 - 2.95 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm)**: 165.1 (NHCON), 161.4 (OC_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 147.2 (C_{Ar}), 142.7 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Im}), 124.9 (CH_{Im}), 121.9 (CH_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 117.6 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 68.2 (OCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 44.3 (CH₂CH₂NH₃⁺), 43.5 (OCH₂CH₂), 39.6 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 36.6 (ThiazCH₂CH₂), 34.3 (ThiazCH₂CH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 3.6 min; **HRMS (ESI positive, m/z)**: calculated for C₂₈H₃₃N₇O₂S 531.2416; found 531.2424 (1.52 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₂H₃₅F₆N₇O₆S: C. 50.59; H. 4.64; N. 12.91; S. 4.22; Found: C. 51.01; H. 4.43; N. 12.36; S. 4.31.

***N* -((1-(4-(4-(2-(Naphthalen-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)ethane-1,2-diaminium 2,2,2-trifluoroacetate (1.33)**

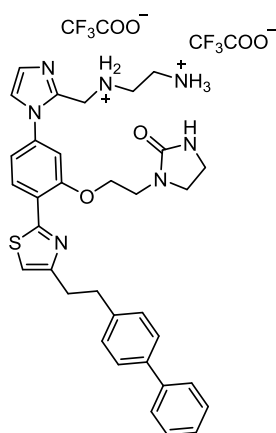


Following the general Boc deprotection procedure, a solution of **(1.28)** (46 mg, 0.06 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) was treated with TFA (0.5 mL). After working up, 47 mg (>99%) of a colourless oil, identified as **(1.33)**, were obtained. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.54 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.89 - 7.70 (m, 4H, Ar), 7.64 (d, J = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.48 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.45 - 7.33 (m, 3H, Ar), 7.30 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.23 (s, 1H, Ar), 4.48 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 4.23 (s, 2H, ImCH₂NH), 3.71 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.59 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.26 (s, 4H, ThiazCH₂CH₂), 3.09 (dd, J =

EXPERIMENTAL

6.5, 4.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 3.02 (dd, $J = 7.2, 5.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 165.0 (NHCON), 162.8 (OC_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 147.2 (C_{Ar}), 140.2 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 133.6 (CH_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Im}), 124.8 (CH_{Im}), 122.0 (CH_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 117.7 (CH_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 68.2 (OCH_2), 49.9 (ImCH_2), 46.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 44.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 43.5 (OCH_2CH_2), 39.6 (CH_2NH_3^+), 39.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 36.8 ($\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$), 34.0 ($\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$); HPLC (*Gradient A*, *Agilent*): $t_r = 6.7$ min; HRMS (ESI positive, m/z): calculated for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ 581.2573; found 581.2563 (-1.67 ppm); Elemental analysis: calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$: C. 53.40; H. 4.61; N. 12.11; S. 3.96; Found: C. 52.85; H. 4.62; N. 12.37; S. 4.21.

***N'*-((1-(4-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-imidazol-2-yl)methyl)ethane-1,2-diaminium 2,2,2-trifluoroacetate (1.34)**



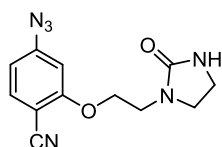
Following the general Boc deprotection procedure, (**1.29**) (60 mg, 0.07 mmol) dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) was treated with TFA (0.5 mL). After the work up, 61 mg (>99%) of a colourless oil, identified as (**1.34**), were obtained. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 8.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.78 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.65 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar), 7.60 - 7.56 (m, 2H, Ar), 7.54 - 7.49 (m, 2H, Ar), 7.48 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.41 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, Ar), 7.35 - 7.25 (m, 5H, Ar), 4.49 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 4.24 (s, 2H, ImCH_2NH), 3.72 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.61 (dd, $J = 9.1, 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.35 (dd, $J = 9.1, 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.24 - 3.12 (m, 4H, $\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$) 3.10

(dd, $J = 6.6, 4.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 3.03 (dd, $J = 7.0, 5.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 162.0 (OC_{Ar}), 161.4 (C_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 147.1 (C_{Ar}), 142.3 (C_{Ar}), 141.9 (C_{Ar}), 140.2 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 125.6 (CH_{Im}), 124.9 (CH_{Im}), 121.9 (CH_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 117.7 (C_{Ar}), 111.7 (C_{Ar}), 68.2 (OCH_2), 46.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 44.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 43.5 (OCH_2CH_2), 39.6 (CH_2NH_3^+), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 36.2 ($\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$), 34.1 ($\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$); HPLC (*Gradient A*, *Agilent*): $t_r = 7.5$ min; HRMS (ESI positive, m/z): calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ 607.2729; found 607.2739 (1.57 ppm); Elemental analysis: calculated for $\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_6\text{S}$: C. 54.61; H. 4.70; N. 11.73; S. 3.84; Found: C. 54.15; H. 4.38; N. 11.83; S. 4.20.

E1.7. Synthesis and characterization of triazole-phenyl-thiazoles (Chapter - 2)

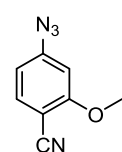
• Synthesis of azide intermediates

4-Azido-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)benzonitrile (2.1)



A flask charged with the bromoarene **(1.6)** (500 mg, 1.61 mmol) and NaN_3 (1.57 g, 24.2 mmol) in anhydrous DMSO (30 mL), in the presence of molecular sieves (4 Å) and argon atmosphere, was heated at 100 °C for 72 h. The disappearance of starting material was monitored by analytical HPLC (Gradient: from 2% to 95% CH_3CN in 10 min). The reaction was allowed to cool to room temperature and then was diluted with H_2O (60 mL). The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL) and the combined organic layers were dried (Na_2SO_4), filtered, evaporated to dryness and lyophilized if necessary. The final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:3) to obtain 372 mg (85%) of a yellow solid identified as **(2.1)**. **M.p:** 158-161 °C; **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 3230 (NH-st), 3090 ($\text{C}_{\text{sp}}\text{-H}$ st), 2223 ($\text{C}\equiv\text{N}$ st), 2125 ($\text{N}=\text{N}=\text{N}$ st), 1702 ($\text{C}=\text{O}$ st); **^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm):** 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 6.70 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H, Ar), 6.53 (d, J = 1.8 Hz, 1H, Ar), 4.71 (br s, 1H, NHCON), 4.20 (t, J = 4.7 Hz, 2H, OCH_2), 3.81 - 3.76 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.64 (t, J = 4.9 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.44 (t, J = 8.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$); **^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm):** 162.8 (NHCON), 161.8 (OC_{Ar}), 146.8 (C_{Ar}), 134.9 (CH_{Ar}), 116.2 (CN), 111.8 (CH_{Ar}), 103.2 (CH_{Ar}), 98.3 (C_{Ar}), 69.4 (OCH_2), 47.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.2 (OCH_2CH_2), 38.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$); **MS (ESI, positive mode) m/z :** 567.2 [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 295.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 273.0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

4-Azido-2-methoxybenzonitrile (2.48)



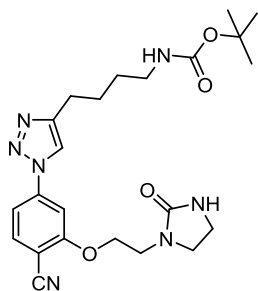
Following the same procedure described for compound **(2.1)**, the commercially available bromide 4-bromo-2-methoxybenzonitrile (500 mg, 2.36 mmol) was treated with NaN_3 (2.30 g, 35.4 mmol) in anhydrous DMSO (30 mL) in the presence of molecular sieves (4 Å) under argon atmosphere. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:2) to give 304 mg (74%) of a white solid identified as **(2.48)**. **^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm):** 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 6.69 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H, Ar), 6.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 3.92 (s, 3H, OCH_3); **^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm):** 162.7 (OC_{Ar}), 146.7 (C_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 116.2 (CN), 111.4 (CH_{Ar}), 102.6 (CH_{Ar}), 98.3 (C_{Ar}), 56.4 (OCH_3); **MS (ESI, positive mode) m/z :** 197.0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 175.0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

EXPERIMENTAL

• General procedure for the 1,2,3-triazole formation by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)

The azide intermediate (1 eq) was treated with the corresponding terminal alkyne (1.2 eq) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 eq) in EtOH. Sodium ascorbate (0.40 eq) and H_2O were subsequently added and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight in darkness conditions. Then, EtOH was evaporated to dryness. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL) and washed with H_2O (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried with Na_2SO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. The final residue was purified by flash column chromatography (eluents are specified in each case).

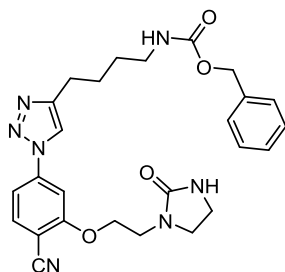
***tert*-Butyl (4-(1-(4-cyano-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.4)**



Following the general procedure of CuAAC, azide (**2.1**) (250 mg, 0.92 mmol) was reacted with the commercially available *tert*-butyl 5-hexynylcarbamate (248 mg, 1.19 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (23 mg, 0.09 mmol) in EtOH (25 mL). Sodium ascorbate (73 mg, 0.40 mmol) and H_2O (25 mL) were added and the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:2) to

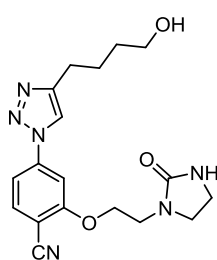
yield 242 mg (56%) of a colourless oil identified as (**2.4**). **M.p:** 139-142 °C; **IR (KBr), ν (cm^{-1}):** 3396 (NH-st), 2226 ($\text{C}\equiv\text{N}$ st), 1691 ($\text{C}=\text{O}$ st); **^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm):** 7.93 (s, 1H, Ar), 7.68 (dd, J = 8.4, 2.4 Hz, 1H, Ar), 7.57 (s, 1H, Ar), 7.39 (d, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 4.78 (br s, 1H, NHCON), 4.69 (br s, 1H, NHBoc), 4.35 - 4.31 (m, 2H, OCH_2), 3.75 (t, J = 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.67 - 3.62 (m, 2H, OCH_2CH_2), 3.45 (t, J = 7.4 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.15 (q, J = 6.0 Hz, 2H, CH_2NHBoc), 2.82 (t, J = 6.6 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.76 (quin, J = 7.7 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.57 (quin, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1.42 (s, 9H, CH_3); **^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm):** 162.8 (NHCON), 161.5 (OC_{Ar}), 156.2 (NHCOO), 149.3 (C_{Ar}), 141.6 (C_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 112.1 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 101.6 (C_{Ar}), 79.3 ($\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 69.2 (OCH_2), 47.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.0 (OCH_2CH_2), 40.3 (CH_2NHBoc), 38.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 28.5 (CH_3), 26.3 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.2 (TrizCH_2); **MS (ESI, positive mode) m/z :** 492.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 470.3 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

Benzyl (4-(1-(4-cyano-3-((1-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.12)



Following the general CuAAC procedure, azide **(2.1)** (450 mg, 1.65 mmol) was treated with the commercially available benzyl 5-hexynylcarbamate (523 mg, 2.15 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (42 mg, 0.17 mmol) in EtOH (25 mL). Sodium ascorbate (131 mg, 0.66 mmol) and H_2O (25 mL) were subsequently added and the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:3) to provide 573 mg (69%) of a colourless oil identified as **(2.12)**. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.86 (s, 1H, Ar), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 7.49 (s, 1H, Ar), 7.34 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, Ar), 7.32 - 7.17 (m, 5H, Ar), 5.05 (br s, 1H, NHCbz), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.68 (br s, 1H, NHCON), 4.26 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, OCH_2), 3.66 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.57 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.33 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.18 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2NHCbz), 2.76 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.71 (quin, $J = 7.4$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.52 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.8 (NHCON), 161.5 (OC_{Ar}), 156.6 (NHCOO), 149.2 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 136.6 (CH_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 112.1 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 101.5 (C_{Ar}), 69.0 (OCH_2), 66.7 (NHCOOCH_2), 47.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.8 (OCH_2CH_2), 40.8 (CH_2NHCbz), 38.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 26.1 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.1 (TrizCH_2); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_4$ 503.2281; Found 503.2279 (-0.33 ppm).

4-(4-(4-hydroxybutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)benzonitrile (2.39)

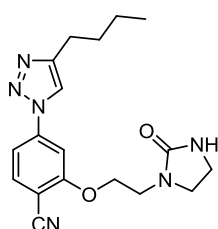


Following the general CuAAC procedure, azide **(2.1)** (250 mg, 0.92 mmol) was treated with the commercially available 5-hexyn-1-ol (122 mg, 1.19 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (23 mg, 0.09 mmol) in EtOH (20 mL). After the addition of sodium ascorbate (73 mg, 0.40 mmol) and H_2O (20 mL), the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:7) to yield 204 mg (55%) of a white solid identified as **(2.39)**. **M.p.**: 138-140 °C; $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 8.48 (s, 1H, Ar), 7.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.70 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar), 7.61 (dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, 1H, Ar), 4.39 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, OCH_2), 3.76 (dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.64 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2OH), 3.43 (dd, $J = 9.0, 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.82 (t, $J = 7.6$ Hz,

EXPERIMENTAL

2H, TrizCH_2), 1.82 (quin, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.63 (quin, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 162.9 (OC_{Ar}), 150.5 (C_{Ar}), 142.9 (C_{Ar}), 136.3 (CH_{Ar}), 121.5 (CH_{Ar}), 116.6 (CN), 113.5 (CH_{Ar}), 105.3 (CH_{Ar}), 102.5 (C_{Ar}), 70.1 (OCH_2), 62.5 (CH_2OH), 50.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.9 (OCH_2CH_2), 39.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 33.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 26.7 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 26.1 (TrizCH_2); MS (ESI, positive mode) m/z : 763.5 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 393.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 371.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

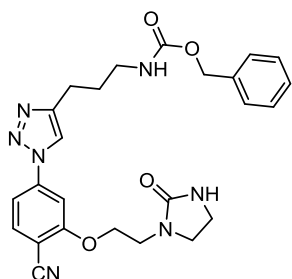
4-(4-Butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)benzonitrile (2.40)



Following the general procedure of CuAAC, azide (**2.1**) (269 mg, 0.99 mmol) was reacted with the commercially available 1-hexyne (109 mg, 1.28 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25 mg, 0.10 mmol) in EtOH (20 mL). Sodium ascorbate (78 mg, 0.40 mmol) and H_2O (20 mL) were subsequently added and the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness.

The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:1) to obtain 277 mg (79%) of a white solid identified as (**2.40**). M.p: 187-190 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7.80 (s, 1H, Ar), 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 7.53 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar), 7.36 (dd, $J = 8.4, 1.9$ Hz, 1H, Ar), 4.53 (br s, 1H, NHCON), 4.34 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, OCH_2), 3.79 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.68 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.46 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.80 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.73 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.52 (sex, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 161.6 (OC_{Ar}), 150.1 (C_{Ar}), 141.6 (C_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 118.7 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 112.0 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 101.6 (C_{Ar}), 69.5 (OCH_2), 47.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.1 (OCH_2CH_2), 38.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 31.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.4 (TrizCH_2), 22.4 (CH_2CH_3), 13.9 (CH_3); MS (ESI, positive mode) m/z : 377.2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 355.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Benzyl (3-(1-(4-cyano-3-((1-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)carbamate (2.41)

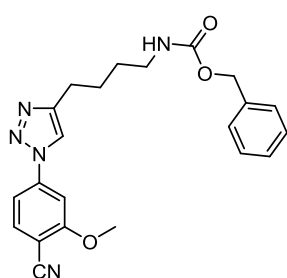


Following the general procedure of CuAAC, azide (**2.1**) (600 mg, 2.20 mmol) was reacted with the commercially available benzyl 4-pentynylcarbamate (622 mg, 2.86 mmol) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (55 mg, 0.22 mmol) in EtOH (25 mL). Then, sodium ascorbate (175 mg, 0.88 mmol) and H_2O (25 mL) were added and the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column

chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:2) affording 779 mg (72%) of a colourless oil identified as (**2.41**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.01 (s, 1H, Ar), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, Ar), 7.55 (s, 1H, Ar), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.32 - 7.18 (m, 5H, Ar), 5.48 (br s, 1H, NHCBz), 5.02 (s, 2H,

NHCOOCH₂), 4.70 (br s, 1H, NHCON), 4.26 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.55 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.25 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.16 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.85 - 1.79 (m, 2H, TrizCH₂CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.9 (NHCON), 161.4 (OC_{Ar}), 156.7 (NHCOO), 148.4 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 136.5 (CH_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 119.7 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 112.0 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 101.4 (C_{Ar}), 68.6 (OCH₂), 66.9 (NHCOOCH₂), 47.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.6 (OCH₂CH₂), 39.8 (CH₂NHCbz), 38.5 (CH₂CH₂NHCON), 29.0 (TrizCH₂CH₂), 22.3 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₅H₂₇N₇O₄ 489.2124; Found 489.2126 (0.21 ppm).

Benzyl (4-(1-(4-cyano-3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.49)



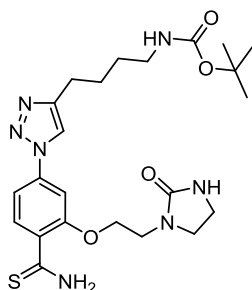
Following the general CuAAC procedure, azide (**2.48**) (590 mg, 2.71 mmol) was treated with benzyl 5-hexynylcarbamate (858 mg, 3.52 mmol) and CuSO₄·5H₂O (68 mg, 0.27 mmol) in EtOH (25 mL). Sodium ascorbate (215 mg, 1.08 mmol) and H₂O (25 mL) were added and the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness.

The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by flash column chromatography (Firstly: hexane/AcOEt, 80:20; Secondly: CH₂Cl₂/MeOH, 100:2) to obtain 963 mg (88%) of a yellow oil identified as (**2.49**). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.79 (s, 1H, Ar), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.49 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.31 - 7.14 (m, 6H, Ar), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.90 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, NHCbz), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 3.17 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.71 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.55 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 162.5 (OC_{Ar}), 156.6 (NHCOO), 149.2 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 136.6 (C_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 115.6 (CN), 111.5 (CH_{Ar}), 103.6 (CH_{Ar}), 101.6 (C_{Ar}), 66.7 (NHCOOCH₂), 56.7 (OCH₃), 40.7 (CH₂NHCbz), 29.5 (CH₂CH₂NHCbz), 26.3 (TrizCH₂CH₂), 25.4 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₂H₂₃N₅O₃ 405.1801; Found 405.1794 (1.8 ppm).

• General procedure for the synthesis of thioamides from nitriles by tiation

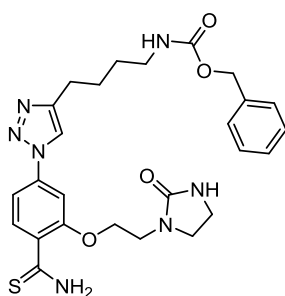
A solution of the corresponding benzonitriles (1 eq) in DMF was treated with a 20% solution of (NH₄)₂S (70 eq) in water. A change of yellow to dark blue color was instantly observed. The reaction mixture was heated at 80 °C for 4 h and then allowed to cool to room temperature. CH₂Cl₂ (50 mL) was added and the resulting mixture was washed with HCl 0.1 N (2 x 50 mL), H₂O (1 x 50 mL) and brine (1 x 50 mL). The organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated to dryness. The residue was purified by flash column chromatography (eluents are specified for each compound)

tert-Butyl (4-(1-(4-carbamothioyl-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.5)



Following the general thionation procedure, a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 20% aq (1 mL, 13.8 mmol) was added over the benzonitrile (**2.4**) (88 mg, 0.19 mmol) dissolved in DMF (10 mL) and then, reaction mixture was heated to 80 °C for 4 h. After the work up, the crude was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:5) to provide 64 mg (67%) of a yellow oil characterized as (**2.5**). IR (KBr), ν (cm^{-1}): 3351 (NH st), 1682 (C=O st); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 10.10 (br s, 1H, SCNH₂), 9.43 (br s, 1H, SCNH₂), 8.68 (s, 1H, Ar), 7.88 (dd, J = 8.4, 1.1 Hz, 1H, Ar), 7.56 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.51 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H, Ar), 6.82 (br s, 1H, NHCON), 6.38 (br s, 1H, NHBoc), 4.25 (t, J = 5.2 Hz, 2H, OCH₂), 3.55 - 3.45 (m, 4H, CH₂CH₂NHCON, OCH₂CH₂), 3.22 (t, J = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.98 - 2.93 (m, 2H, CH₂NHBoc), 2.71 (t, J = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.70 - 1.60 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.51 - 1.41 (m, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1.36 (s, 9H, CH₃); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 197.5 (SCNH₂), 162.2 (NHCON), 155.6 (NHCOO), 154.3 (OC_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 132.5 (CH_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 111.1 (CH_{Ar}), 103.9 (CH_{Ar}), 77.3 (OC(CH₃)₃), 67.7 (OCH₂), 45.6 (CH₂CH₂NHCON), 42.6 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 29.0 (CH₂CH₂NHBoc), 28.3 (CH₃), 26.0 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂); MS (ESI, positive mode) m/z : 526.3 [M+Na]⁺, 504.3 [M+H]⁺

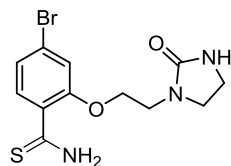
Benzyl (4-(1-(4-carbamothioyl-3-((1-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.13)



Following the general procedure of thionation, the benzonitrile (**2.12**) (400 mg, 0.79 mmol) in DMF (25 mL) was treated with a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 20% aq (3.78 mL, 55.6 mmol). After working up, the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:5) to give 354 mg (74%) of a yellow oil characterized as (**2.13**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 9.63 (br s, 1H, SCNH₂), 9.50 (br s, 1H, SCNH₂), 8.71 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.78 (s, 1H, Ar), 7.45 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.36 - 7.17 (m, 5H, Ar), 7.10 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H, Ar), 5.96 (br s, 1H, NHCbz), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.98 (br s, 1H, NHCON), 4.16 (t, J = 4.4 Hz, 2H, OCH₂), 3.64 (t, J = 4.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.50 (dd, J = 9.7, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.40 (dd, J = 9.1, 6.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.17 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.73 (t, J = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.70 (quin, J = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.53 (quin, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 196.5 (SCNH₂), 163.5 (NHCON), 156.3 (NHCOO), 149.1 (C_{Ar}), 140.3 (C_{Ar}), 138.4 (CH_{Ar}), 136.7 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 125.1 (C_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 111.3

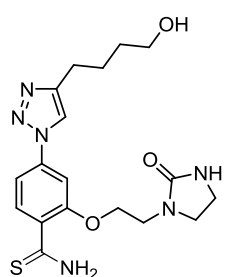
(CH_{Ar}), 104.0 (CH_{Ar}), 66.8 (OCH₂), 66.6 (NHCOOCH₂), 45.4 (CH₂CH₂NHCON), 43.2 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 38.3 (CH₂CH₂NHCON), 29.8 (CH₂CH₂NHCbz), 26.4 (TrizCH₂CH₂), 25.3 (TrizCH₂); **MS (ESI, positive mode) m/z**: 538.3 [M+H]⁺

4-Bromo-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)benzothioamide (**2.31**)

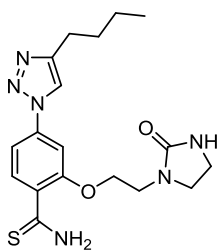


Following the general procedure of thionation, the bromobenzonitrile (**1.6**) (1.15 g, 3.71 mmol) dissolved in DMF (25 mL) was treated with a solution of (NH₄)₂S 20% aq (17.6 mL, 0.26 mol). After the work up, the crude was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:2) to obtain 845 mg (69%) of a yellow solid characterized as (**2.31**). **M.p.**: Decompose without melting; **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm)**: 10.03 (br s, 1H, SCNH₂), 9.35 (br s, 1H, SCNH₂), 8.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.31 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.17 (dd, *J* = 8.4, 1.8 Hz, 1H, Ar), 6.35 (br s, 1H, NHCON), 4.16 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, OCH₂), 3.47 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.42 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm)**: 197.6 (SCNH₂), 162.3 (NHCOO), 154.1 (OC_{Ar}), 132.6 (CH_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 123.2 (CH_{Ar}), 115.6 (C_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.6 (CH₂CH₂NHCON), 42.6 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂CH₂NHCON); **MS (ESI, positive mode) m/z**: 346.0 [M+H]⁺, with a Br isotopic pattern.

4-(4-(4-Hydroxybutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)benzothioamide (**2.42**)

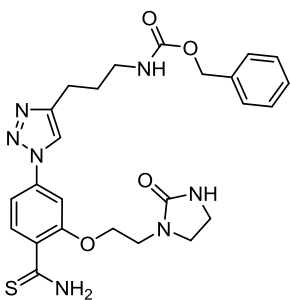


Following the general procedure of thionation, benzonitrile (**2.39**) (375 mg, 1.01 mmol) dissolved in DMF (15 mL) was reacted with a solution of (NH₄)₂S 20% aq (4.8 mL, 70.9 mmol). After the work up, 408 mg (>99%) of a yellow solid was obtained, and this product identified as (**2.42**), was used in the subsequent reaction without further purification. **M.p.**: Decompose without melting; **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.47 (s, 1H, Ar), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.49 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, Ar), 4.34 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.70 - 3.58 (m, 6H, CH₂OH, OCH₂CH₂, CH₂CH₂NHCON), 3.41 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.86 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.87 - 1.77 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.68 - 1.59 (m, 2H, CH₂CH₂OH); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm)**: 200.5 (SCNH₂), 165.6 (NHCON), 156.9 (OC_{Ar}), 150.6 (C_{Ar}), 141.1 (C_{Ar}), 135.5 (CH_{Ar}), 130.9 (C_{Ar}), 121.9 (CH_{Ar}), 113.2 (CH_{Ar}), 105.9 (CH_{Ar}), 69.2 (OCH₂), 63.0 (CH₂OH), 47.6 (CH₂CH₂NHCON), 44.4 (OCH₂CH₂), 39.7 (CH₂CH₂NHCON), 33.4 (CH₂CH₂OH), 27.2 (TrizCH₂CH₂), 26.5 (TrizCH₂); **MS (ESI, positive mode) m/z**: 831.3 [2M+Na]⁺, 427.0 [M+Na]⁺, 405.2 [M+H]⁺

4-(4-Butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)benzothioamide (2.43)

Following the general thionation procedure, the benzonitrile (**2.40**) (550 mg, 1.55 mmol) dissolved in DMF (18 mL) was reacted with a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 20% aq (7.4 mL, 109 mmol) and reaction mixture was heated to 80 °C for 4 h. After the work up, the crude was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:2) to yield 505 mg (84%) of a yellow solid characterized as (**2.43**). **M.p.**: 145-148 °C; **^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ**

(ppm): 9.74 (br s, 1H, SCNH_2), 9.59 (br s, 1H, SCNH_2), 8.81 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.79 (s, 1H, Ar), 7.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.16 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H, Ar), 6.05 (br s, 1H, NHCON), 4.25 (t, J = 4.4 Hz, 2H, OCH_2), 3.75 (t, J = 4.5 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.58 (dd, J = 9.8, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.50 (dd, J = 9.0, 6.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.79 (t, J = 7.7 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.71 (quin, J = 7.7 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.42 (sex, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3); **^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm)**: 195.9 (SCNH_2), 163.6 (NHCON), 156.4 (OC_{Ar}), 149.8 (C_{Ar}), 140.3 (C_{Ar}), 138.4 (CH_{Ar}), 124.9 (C_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 111.0 (CH_{Ar}), 103.8 (CH_{Ar}), 66.8 (OCH_2), 45.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.3 (OCH_2CH_2), 38.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 31.5 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.4 (TrizCH_2), 22.4 (CH_2CH_3), 13.9 (CH_3); **MS (ESI, positive mode) m/z** : 389.2 [$\text{M}+\text{H}$]⁺

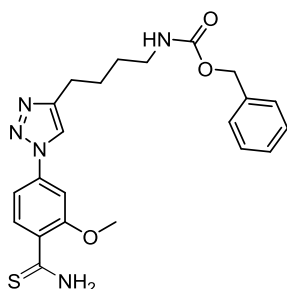
Benzyl 3-(1-(4-carbamothioyl-3-((1-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)carbamate (2.44)

Following the general thionation procedure, a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 20% aq (7.6 mL, 0.11 mol) was added over the benzonitrile (**2.41**) (779 mg, 1.59 mmol) dissolved in DMF (22 mL) and then, reaction mixture was heated to 80 °C for 4 h. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:5) to afford 655 mg (79%) of a yellow oil characterized as (**2.44**). **^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm)**: 9.69 (br

s, 1H, SCNH_2), 9.49 (br s, 1H, SCNH_2), 8.69 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.84 (s, 1H, Ar), 7.42 (s, 1H, Ar), 7.38 - 7.13 (m, 5H, Ar), 7.09 (dd, J = 8.7, 2.0 Hz, 1H, Ar), 6.03 (br s, 1H, NHCON), 5.18 (t, J = 6.2 Hz, 1H, NHCbz), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.13 (t, J = 4.3 Hz, 2H, OCH_2), 3.63 (t, J = 4.5 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.49 (dd, J = 9.4, 6.4 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.38 (dd, J = 9.4, 6.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.19 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2NHCbz), 2.74 (t, J = 7.4 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.93 - 1.80 (m, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$); **^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm)**: 196.9 (SCNH_2), 163.3 (NHCON), 156.8 (NHCOO), 156.2 (OC_{Ar}), 148.4 (C_{Ar}), 140.4 (C_{Ar}), 138.1 (CH_{Ar}), 137.0 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 119.4 (CH_{Ar}), 111.6 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 66.9 (OCH_2), 66.8 (NHCOOCH_2), 45.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.3 (OCH_2CH_2), 40.5 (CH_2NHCbz), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.5

(CH₂CH₂NHCbz), 22.8 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₅H₂₉N₇O₄S 523.2002; Found 523.2007 (0.96 ppm).

Benzyl (4-(1-(4-carbamothioyl-3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.50)



Following the general thionation procedure, the benzonitrile (**2.49**) (1.07 g, 2.64 mmol) dissolved in DMF (25 mL) was reacted with a solution of (NH₄)₂S 20% aq (12.6 mL, 0.19 mol) and the reaction mixture was heated to 80 °C for 4 h. After the work up, 1.15 g (>99%) of a yellow oil was obtained. This product identified as (**2.50**) was used in the subsequent reaction without further purification. **¹H**

NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 10.08 (br s, 1H, SCNH₂), 9.42 (br s, 1H, SCNH₂), 8.67 (s, 1H, Ar), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.54 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.49 (dd, 1H, *J* = 8.4, 2.0 Hz, Ar), 7.40 - 7.17 (m, 6H, Ar, NHCbz), 5.01 (s, 2H, NHCOOCH₂), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.06 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.72 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.68 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.50 (quin, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm)**: 197.5 (SCNH₂), 156.1 (OC_{Ar}), 155.2 (NHCOO), 148.1 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 132.4 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 120.4 (CH_{Ar}), 110.9 (CH_{Ar}), 103.2 (CH_{Ar}), 65.1 (NHCOOCH₂), 56.3 (OCH₃), 40.0 (CH₂NHCbz), 28.9 (CH₂CH₂NHCbz), 26.0 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₂H₂₅N₅O₃S 439.1678; Found 439.1674 (-0.96 ppm).

• **General procedure for the Hantzsch thiazole synthesis (Chapter - 2)**

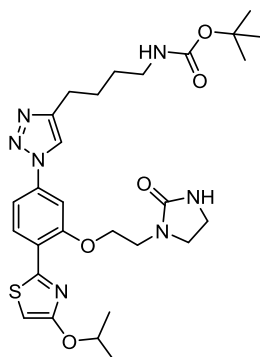
A solution of the corresponding thioamide (1 eq) in ⁱPrOH, was treated with the appropriated α-haloketone precursors (1 eq). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 3 - 6 h in a pressure flask and then, it was allowed to cool to room temperature and was concentrated to dryness under reduced pressure. The final residue was purified by flash column chromatography or Chromatotron (elutents are specified in each case).

***tert*-Butyl (4-(1-(4-(4-isopropoxythiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.6) and 1-(2-(5-(4-(4-Aminobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-isopropoxythiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.9)**

Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with thioamide (**2.5**) (87 mg, 0.17 mmol) and isopropyl chloroacetate (0.25 mL, 1.99 mmol) in ⁱPrOH (8 mL) was stirred at 70 °C for 6 h. Reaction progress was monitorized by TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) observing the partial deprotection of Boc group. The final residue was purification by

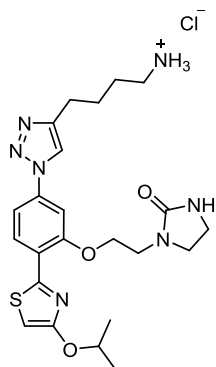
EXPERIMENTAL

flash column chromatography (from CH₂Cl₂/MeOH, 97:3 to CH₂Cl₂/MeOH/NH₃, 85:14:1). From the fastest moving band (**2.6**) (27 mg, 26%) was isolated as a colourless oil.



(2.6) ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.72 (s, 1H, Ar), 8.34 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.73 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.66 (dd, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 1H, Ar), 6.81 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 6.64 (br s, 1H, NHCON), 6.56 (br s, 1H, NHBoc), 4.73 (quin, *J* = 6.1 Hz, 1H, OCH(CH₃)₂), 4.47 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 3.01 - 2.91 (m, 2H, CH₂NHBoc), 2.75 - 2.68 (m, 2H, TrizCH₂), 1.71 - 1.60 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.53 - 1.41 (m, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1.36 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.32 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, CH(CH₃)₂); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm):** 162.2 (NHCON), 156.7 (OC_{Ar}), 155.9 (OC_{Ar}), 155.6 (NHCOO), 148.2 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 120.3 (C_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 93.1 (CH_{Ar}), 77.4 (OC(CH₃)₃), 71.8 (OCH(CH₃)₂), 67.6 (OCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 29.0 (CH₂CH₂NHBoc), 28.3 (C(CH₃)₃), 26.1 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂), 21.9 (CH(CH₃)₂); **MS (ESI, positive mode) m/z:** 1193.5 [2M+Na]⁺, 608.3 [M+Na]⁺, 586.3 [M+H]⁺

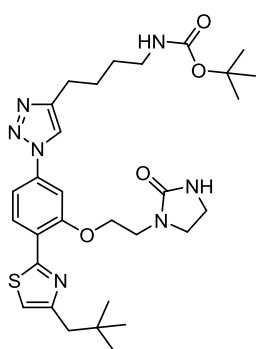
The slowest moving band afforded 43 mg (47%) of (**2.9**) as a yellow oil.



(2.9) ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.83 (s, 1H, Ar), 8.30 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.75 (s, 1H, Ar), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 6.60 (s, 1H, Ar), 6.42 (br s, 1H, NHCON), 4.73 (quin, *J* = 6.1 Hz, 1H, OCH(CH₃)₂), 4.50 - 4.40 (m, 2H, OCH₂), 3.65 - 3.55 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.48 (t, *J* = 7.4 Hz, CH₂CH₂NHCON), 3.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.79 - 2.62 (m, 4H, TrizCH₂, CH₂NH₃⁺), 1.75 - 1.65 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.63 - 1.53 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 1.31 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H, CH₃); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm):** 162.1 (NHCON), 156.7 (OC_{Ar}), 155.9 (OC_{Ar}), 148.0 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 120.8 (CH_{Ar}), 120.5 (C_{Ar}), 111.9 (CH_{Ar}), 104.2 (CH_{Ar}), 93.0 (CH_{Ar}), 71.8 (OCH₂), 67.5 (OCH(CH₃)₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 28.6 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.8 (TrizCH₂CH₂), 24.6 (TrizCH₂), 21.9 (CH₃); **HPLC (G_{b1}):** t_r = 4.3 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for C₂₃H₃₁N₇O₃S 485.2203; Found 485.2209 (-1.19 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₂₃H₃₂ClN₇O₃S: C. 52.92; H. 6.18; N. 18.78; S. 6.14; Found: C. 53.15; H. 6.16; N. 19.05; S. 5.65.

tert-Butyl (4-(1-(4-(4-neopentylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.7) and **1-(2-(5-(4-(4-Aminobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-neopentylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.10)**

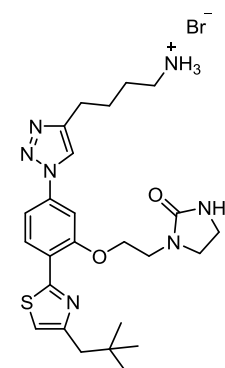
Following the general synthetic procedure of Hantzsch cyclization, a pressure flask charged with thioamide (**2.5**) (50 mg, 0.10 mmol) and the bromoketone (**1.18**) (77 mg, 0.40 mmol) in *i*PrOH (8 mL) was heated at 70 °C for 4 h. Reaction progress was monitored by TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) and by HPLC-MS. The final residue was purified by flash column chromatography (from CH₂Cl₂/MeOH, 96:4 to CH₂Cl₂/MeOH/NH₃, 85:14:1). From the fastest moving band (**2.7**) (27 mg, 46%) was isolated as a colourless oil.



(2.7) ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.45 (s, 1H, Ar), 8.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.58 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.21 (s, 1H, Ar), 4.50 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.77 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.62 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.38 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NHBoc), 2.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 2.75 (s, 2H, CH₂-^tBu), 1.77 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.59 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHBoc), 1.43 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 1.00 (s, 9H, CH₂C(CH₃)₃); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm):**

165.1 (NHCON), 161.1 (OC_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 150.0 (C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 123.9 (C_{Ar}), 121.5 (CH_{Ar}), 118.4 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.8 (CH_{Ar}), 79.9 (OC(CH₃)₃), 68.4 (OCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 45.7 (CH₂-^tBu), 43.9 (OCH₂CH₂), 41.0 (CH₂NHBoc), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 32.4 (CH₂C(CH₃)₃), 30.4 (CH₂CH₂NHBoc), 30.0 (CH₂C(CH₃)₃), 28.8 (OC(CH₃)₃), 27.6 (TrizCH₂CH₂), 26.0 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for C₃₀H₄₃N₇O₄S 597.3097; Found 597.3096 (-0.18 ppm).

The slowest moving band afforded 17 mg (30%) of a yellow oil characterized as (**2.10**).



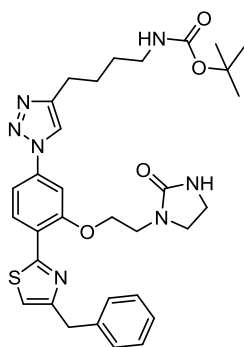
(2.10) ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.46 (s, 1H, Ar), 8.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.73 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.59 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.22 (s, 1H, Ar), 4.50 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.77 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.62 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.38 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.83 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.75 (s, 2H, CH₂-^tBu), 2.70 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.79 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.58 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺), 1.00 (s, 9H, CH₃); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm):** 165.1 (NHCON), 161.1 (OC_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 150.1 (C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 123.9 (C_{Ar}), 121.5 (CH_{Ar}), 118.4 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.7 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 45.7 (CH₂-^tBu), 43.9 (OCH₂CH₂), 42.2 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 33.2 (CH₂CH₂NH₃⁺), 32.4 (CH₂C(CH₃)₃), 30.0 C(CH₃)₃, 27.7

EXPERIMENTAL

(TrizCH₂CH₂), 26.1 (TrizCH₂); **HPLC** (G_{a1}): t_r = 4.1 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₅H₃₅N₇O₂S 497.2573; Found 497.2572 (-0.17 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₂₇H₃₆F₃N₇O₄S: C. 53.02; H. 5.93; N. 16.03; S. 5.24; Found: C. 52.97; H. 6.17; N. 16.29; S. 5.55.

tert-Butyl (4-(1-(4-(4-benzylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.8) and 1-(2-(5-(4-(4-Aminobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-benzylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.11)

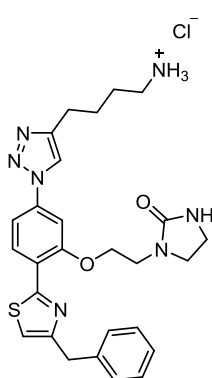
Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.5**) (74 mg, 0.15 mmol) and 1-chloro-3-benzylpropan-2-one (100 mg, 0.60 mmol) in ⁱPrOH (10 mL) was stirred at 70 °C for 4 h. The final residue was purified by flash column chromatography (from CH₂Cl₂/MeOH, 95:5 to CH₂Cl₂/MeOH/NH₃, 85:14:1). From the fastest moving band (**2.8**) (41 mg, 44%) was isolated as a colourless oil.



(2.8) ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm): 8.72 (s, 1H, Ar), 8.40 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.73 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.66 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.40 - 7.14 (m, 6H, Ar), 6.80 (br s, 1H, NHCON), 6.39 (br s, 1H, NHBoc), 4.46 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 4.14 (s, 2H, CH₂Ph), 3.62 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.53 - 3.42 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 - 3.15 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.00 - 2.90 (m, 2H, CH₂NHBoc), 2.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.75 - 1.60 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.52 - 1.43 (m, 2H, CH₂CH₂Boc), 1.36 (s, 9H, OC(CH₃)₃); **HRMS (ES, positive mode) m/z**:

calculated for C₃₂H₃₉N₇O₄S 617.2784; Found 617.2775 (-1.44 ppm).

The slowest moving band afforded 44 mg (55%) of a yellow oil characterized as (**2.11**).

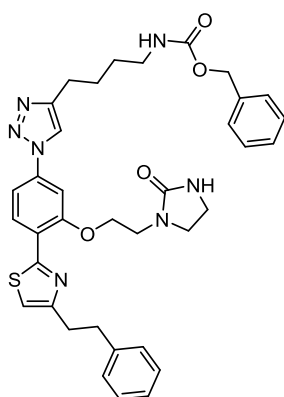


(2.11) ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz) δ (ppm): 8.73 (s, 1H, Ar), 8.39 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.74 (s, 1H, Ar), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.55 - 7.05 (m, 5H, Ar), 7.19 (s, 1H, Ar), 6.43 (br s, 1H, NHCON), 4.46 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH₂), 4.14 (s, 2H, CH₂Ph), 3.62 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.53 - 3.42 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 - 3.15 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.99 - 2.88 (m, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.75 - 2.67 (m, 2H, TrizCH₂), 1.75 - 1.60 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.48 - 1.37 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm)**: 162.1 (NHCON), 155.6 (C_{Ar}), 155.0 (C_{Ar}), 148.3 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}),

121.1 (C_{Ar}), 120.0 (CH_{Ar}), 116.7 (CH_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 37.0 (CH₂Ph), 30.7 (CH₂CH₂NH₃⁺), 29.7 (TrizCH₂CH₂), 26.1 (TrizCH₂); **HPLC** (G_{a1}): t_r = 4.4 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₇H₃₁N₇O₂S 517.2260; Found 517.2256 (-0.69 ppm); **Elemental**

analysis: calculated for $C_{27}H_{32}ClN_7O_2S$: C. 58.53; H. 5.82; N. 17.69; S. 5.79; Found: C. 59.02; H. 6.15; N. 17.63; S. 6.16.

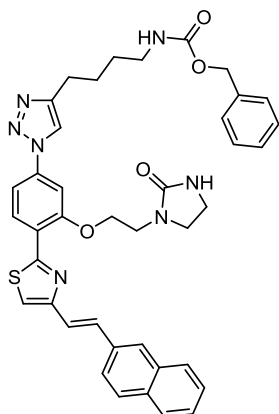
Benzyl (4-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.23)



Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide **(2.13)** (100 mg, 0.19 mmol) and commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (42 mg, 0.19 mmol) in i PrOH (15 mL) was stirred at 70 °C for 4 h. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH_2Cl_2 /MeOH, 97:3) to yield 108 mg (87%) of a colourless oil identified as **(2.23)**. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.46 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.81 (s, 1H, Ar), 7.51 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.38 - 7.06 (m, 11H, Ar), 6.86 (s, 1H, Ar), 5.06 (t, J = 6.0 Hz, 1H, NHCbz),

5.01 (s, 2H, $NHCOOCH_2$), 4.34 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2), 3.69 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.50 (dd, J = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH_2CH_2NHCON), 3.26 (t, J = 7.9 Hz, 2H, CH_2CH_2NHCON), 3.18 (q, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2NHCbz), 3.12 - 2.97 (m, 4H, CH_2CH_2Ph), 2.76 (t, J = 7.4 Hz, 2H, $TrizCH_2$), 1.71 (quin, J = 7.4 Hz, 2H, $TrizCH_2CH_2$), 1.59 (quin, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2CH_2NHCbz); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ (ppm): 162.8 ($NHCON$), 160.3 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 155.9 (C_{Ar}), 148.7 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 122.7 (C_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 115.1 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH_2), 66.7 ($NHCOOCH_2$), 46.4 (CH_2CH_2NHCON), 43.0 (OCH_2CH_2), 40.8 (CH_2NHCbz), 38.4 (CH_2CH_2NHCON), 35.6 (CH_2CH_2Ph), 33.4 (CH_2CH_2Ph), 29.4 (CH_2CH_2NHCbz), 26.4 ($TrizCH_2CH_2$), 25.2 ($TrizCH_2$); **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for $C_{36}H_{39}N_7O_4S$ 665.2784; Found 665.2791 (1.00 ppm).

Benzyl (E)-(4-(1-(4-(4-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.24)

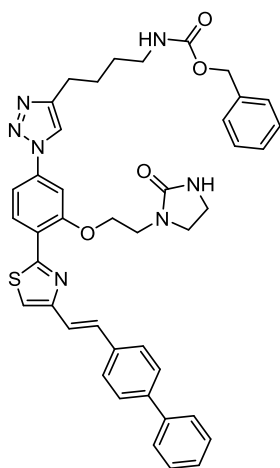


Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide **(2.13)** (520 mg, 0.97 mmol) and the previously obtained α -bromoketone **(1.21)** (267 mg, 0.97 mmol) in i PrOH (30 mL), was stirred at 70 °C for 5 h. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography (CH_2Cl_2 /MeOH, 96:4) to obtain 365 mg (51%) of a yellow oil identified as **(2.24)**. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm): 8.61 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.90 - 7.64 (m, 7H, Ar, ThiazCH=CH), 7.55 (s, 1H, Ar), 7.45 - 7.36 (m, 3H, Ar), 7.30 - 7.14 (m, 7H, Ar, ThiazCH=CH), 5.03 (s, 2H,

EXPERIMENTAL

NHCOOCH₂), 4.97 (br s, 1H, NHCON), 4.48 (br s, 1H, NHCbz), 4.39 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.52 (dd, *J* = 9.0, 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.28 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.20 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.74 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.59 - 1.51 (m, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 161.0 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.2 (C_{Ar}), 153.5 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 138.6 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 134.7 (CH_{Ar}), 133.8 (C_{Ar}), 133.3 (C_{Ar}), 131.5 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Ar}), 121.8 (CH_{Ar}), 119.2 (CH_{Ar}), 117.1 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.7 (OCH₂), 66.8 (NHCOOCH₂), 46.4 (CH₂CH₂NHCON), 43.0 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 29.5 (CH₂CH₂NHCbz), 26.4 (TrizCH₂CH₂), 25.2 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₄₀H₃₉N₇O₄S 713.2784; Found 713.2779 (-0.72 ppm).

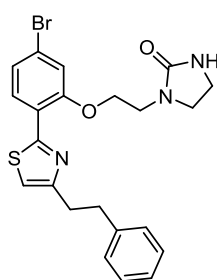
Benzyl (E)-(4-(1-(4-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.25)



Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (200 mg, 0.37 mmol) and the previously synthesized α-bromoketone (**1.22**) (112 mg, 0.37 mmol) in ⁱPrOH (20 mL), was heated at 70 °C for 5 h. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) to give 174 mg (63%) of a colourless oil characterized as (**2.25**). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.81 (s, 1H, Ar), 7.61 - 7.45 (m, 8H, Ar, ThiazCH=CH), 7.40 - 7.31 (m, 3H, Ar), 7.31 - 7.16 (m, 7H, Ar), 7.12 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.68 (br s, 1H, NHCON), 4.36 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.70 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.50 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H,

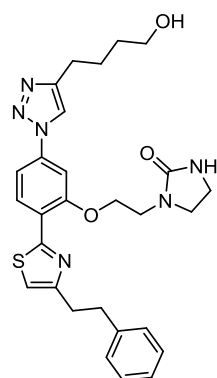
CH₂CH₂NHCON), 3.26 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.16 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.76 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.75 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.55 (quin, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 160.9 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.2 (C_{Ar}), 153.4 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 138.6 (CH_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 136.2 (CH_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 122.4 (C_{Ar}), 121.5 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 117.4 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 67.7 (OCH₂), 66.8 (NHCOOCH₂), 46.4 (CH₂CH₂NHCON), 42.9 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 29.4 (CH₂CH₂NHCbz), 26.4 (TrizCH₂CH₂), 25.2 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₄₂H₄₁N₇O₄S 739.2941; Found 739.2972 (4.21 ppm).

1-(2-(2-(4-Phenethylthiazol-2-yl)-5-bromophenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one (**2.29**)



Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.31**) (200 mg, 0.58 mmol) and the commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (132 mg, 0.58 mmol) in ⁱPrOH (20 mL), was stirred at 70 °C for 4 h. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to yield 241 mg (85%) of a white solid identified as (**2.29**). **M.p.**: 160–162 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.20 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.36–6.99 (m, 7H, Ar), 6.83 (s, 1H, Ar), 4.64 (br s, 1H, NHCON), 4.25 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, OCH₂), 3.69 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.52 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.31 (dd, *J* = 9.1, 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.11–2.97 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 160.6 (OC_{Ar}), 155.9 (C_{Ar}), 155.7 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 124.0 (C_{Ar}), 121.9 (C_{Ar}), 115.9 (CH_{Ar}), 114.9 (CH_{Ar}), 68.5 (OCH₂), 46.7 (CH₂CH₂NHCON), 43.3 (OCH₂CH₂), 38.5 (CH₂CH₂NHCON), 35.7 (ThiazCH₂CH₂), 33.5 (ThiazCH₂CH₂); **HPLC** (G_{b1}): *t_r* = 9.9 min; **HRMS** (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₂₂H₂₂BrN₃O₂S 471.0616; Found 471.0622 (1.32 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₂₂H₂₂BrN₃O₂S: C. 55.94; H. 4.69; N. 8.90; S. 6.79; Found: C. 55.77; H. 4.73; N. 8.71; S. 6.62.

1-(2-(5-(4-(4-Hydroxybutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one (**2.32**)

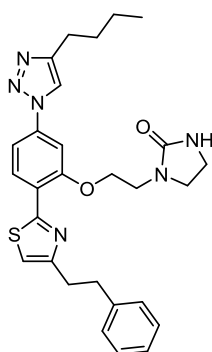


Following the general synthetic procedure of Hantzsch cyclization, a pressure flask charged with the thioamide (**2.42**) (50 mg, 0.12 mmol) and the commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (28 mg, 0.12 mmol) in ⁱPrOH (10 mL), was stirred at 70 °C for 4 h. After the work up, the final residue was purified flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to obtain 53 mg (83%) of a colourless oil characterized as (**2.32**). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.74 (s, 1H, Ar), 8.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.69 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.37 (s, 1H, Ar), 7.29–7.11 (m, 4H, Ar), 7.20–7.15 (m, 1H, Ar), 6.39 (br s, 1H, NHCON), 4.47 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 4.40 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, OH), 3.63 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.54–3.36 (m, 4H, CH₂OH, CH₂CH₂NHCON), 3.22 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.15–3.03 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 2.73 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.73 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.58–1.37 (m, 2H, CH₂CH₂OH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm): 162.5 (NHCON), 159.8 (OC_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 155.7 (C_{Ar}), 148.7 (C_{Ar}), 141.8 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 121.6 (C_{Ar}), 120.6 (CH_{Ar}), 116.3 (CH_{Ar}), 112.3 (CH_{Ar}), 104.6 (CH_{Ar}), 68.0 (OCH₂), 60.8 (CH₂OH), 45.7 (CH₂CH₂NHCON), 42.8 (OCH₂CH₂), 37.9 (CH₂CH₂NHCON), 35.1 (CH₂CH₂Ph), 33.0

EXPERIMENTAL

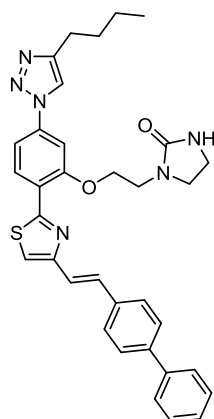
(CH₂CH₂Ph), 32.4 (TrizCH₂CH₂), 25.7 (TrizCH₂), 25.3 (CH₂CH₂OH); **HPLC (G_{b1})**: t_r = 8.0 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₈H₃₂N₆O₃S 532.2257; Found 532.2258 (0.17 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₂₈H₃₂N₆O₃S: C. 63.14; H. 6.06; N. 15.78; S. 6.02; Found: C. 62.55; H. 6.21; N. 15.41; S. 5.81

1-(2-(5-(4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one (2.33)



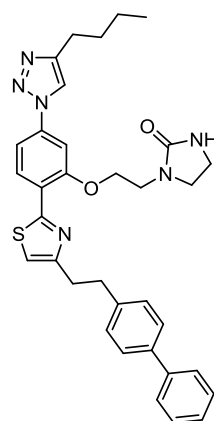
Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.43**) (50 mg, 0.13 mmol) and the commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (31 mg, 0.13 mmol) in *i*PrOH (10 mL), was heated to 70 °C for 3 h. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4) to afford 57 mg (85%) of a colourless oil characterized as (**2.33**). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.73 (s, 1H, Ar), 7.52 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.28 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.24 - 7.09 (m, 5H, Ar), 6.87 (s, 1H, Ar), 4.37 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.54 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.33 (dd, *J* = 8.7, 7.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.19 - 2.93 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 2.74 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.74 - 1.60 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.46 - 1.30 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)**: 162.7 (NHCON), 160.3 (OC_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 149.6 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 122.7 (C_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.6 (CH_{Ar}), 68.2 (OCH₂), 46.5 (CH₂CH₂NHCON), 43.2 (OCH₂CH₂), 38.5 (CH₂CH₂NHCON), 35.7 (CH₂CH₂Ph), 33.5 (CH₂CH₂Ph), 31.6 (TrizCH₂CH₂), 25.5 (TrizCH₂), 22.5 (CH₂CH₃), 14.0 (CH₃); **HPLC (G_{b1})**: t_r = 9.6 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₈H₃₂N₆O₂S 516.2308; Found 516.2310 (0.52 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₂₈H₃₂N₆O₂S: C. 65.09; H. 6.24; N. 16.27; S. 6.21; Found: C. 64.69; H. 6.33; N. 15.79; S. 6.01.

1-(2-(5-(4-butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one (2.46)



Following the general procedure of Hantzsch synthesis, a pressure flask charged with the thioamide (**2.43**) (140 mg, 0.36 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**1.22**) (108 mg, 0.36 mmol) in i PrOH (15 mL) was heated at 70 °C for 4 h. The final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2) to yield 110 mg (65%) of a colourless oil characterized as (**2.46**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.59 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.74 (s, 1H, Ar), 7.64 - 7.47 (m, 8H, Ar, ThiazCH=CH), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.34 - 7.17 (m, 3H, Ar), 7.13 (d, J = 15.9 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 4.60 (br s, 1H, NHCON), 4.38 (t, J = 5.4 Hz, 2H, OCH_2), 3.75 (t, J = 5.4 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.54 (dd, J = 9.0, 6.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.34 (dd, J = 9.1, 6.5 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.74 (t, J = 7.7 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.66 (quin, J = 7.6 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.38 (sex, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 161.0 (OC_{Ar}), 156.3 (C_{Ar}), 153.5 (C_{Ar}), 149.6 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 138.7 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 122.4 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 117.1 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.6 (CH_{Ar}), 68.1 (OCH_2), 46.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.2 (OCH_2CH_2), 38.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 31.6 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.5 (TrizCH_2), 22.5 (CH_2CH_3), 14.0 (CH_3); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ 590.2464; Found 590.2474 (1.66 ppm).

1-(2-(5-(4-Butyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one (2.34)

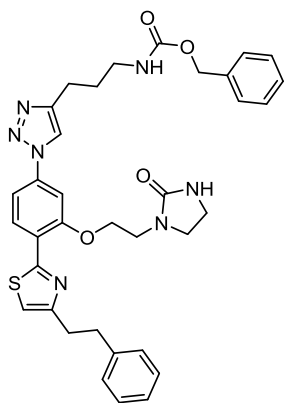


A solution of (**2.46**) (100 mg, 0.17 mmol) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) and in the presence of catalytic amount of Pd/C 10% (20% wt/wt) was subjected to hydrogenation with hydrogen balloon for 2 h at room temperature. After filtration over PTFE membrane filters, volatiles were removed and the crude was co-evaporated with mixtures of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5 x 10 mL). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 97:3) to provide 40 mg (39%) of a white solid identified as (**2.34**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.48 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.73 (s, 1H, Ar), 7.57 - 7.49 (m, 3H, Ar), 7.45 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.30 - 7.14 (m, 4H, Ar), 6.90 (s, 1H, Ar), 4.46 (br s, 1H, NHCON), 4.37 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH_2), 3.74 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.54 (dd, J = 9.0, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.33 (dd, J = 9.1, 6.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.17 - 3.02 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.75 (t, J = 7.7 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.68 (quin, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.38 (sex, J = 7.5 Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.90 (t, J =

EXPERIMENTAL

7.4 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.6 (NHCON), 160.4 (OC_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 149.6 (C_{Ar}), 141.1 (C_{Ar}), 139.0 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 122.7 (C_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 112.6 (CH_{Ar}), 104.6 (CH_{Ar}), 68.2 (OCH₂), 46.5 (CH₂CH₂NHCON), 43.2 (OCH₂CH₂), 38.5 (CH₂CH₂NHCON), 35.3 (ThiazCH₂CH₂), 33.4 (ThiazCH₂CH₂), 31.6 (TrizCH₂CH₂), 25.5 (TrizCH₂), 22.5 (CH₂CH₃), 14.0 (CH₃); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 9.6 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₃₄H₃₆N₆O₂S 592.2621; Found 592.2610 (-1.83 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₄H₃₆N₆O₂S: C. 68.89; H. 6.12; N. 14.18; S. 5.41; Found: C. 68.38; H. 6.27; N. 13.90; S. 5.00.

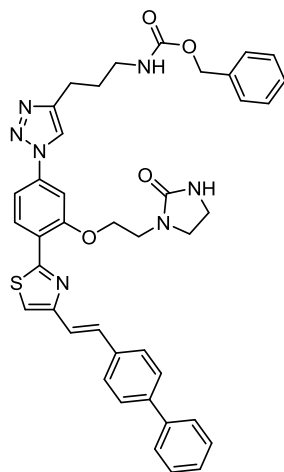
Benzyl (3-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)carbamate (2.45)



Following the general procedure of Hantzsch cyclization, a pressure flask charged with the thioamide (**2.44**) (325 mg, 0.62 mmol) and the commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (141 mg, 0.62 mmol) in ⁱPrOH (30 mL), was stirred at 70 °C for 4 h. After the work up, residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to yield 321 mg (77%) of a colourless oil characterized as (**2.45**). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.85 (s, 1H, Ar), 7.46 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.26 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.24 - 6.97 (m, 10H, Ar), 6.75 (s, 1H, Ar), 5.30

(br s, 1H, NHCbz), 4.93 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.43 (br s, 1H, NHCON), 4.25 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.56 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.15 - 3.05 (m, 4H, CH₂CH₂NHCON, CH₂NHCbz), 3.01 - 2.82 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 2.69 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.79 (quin, *J* = 6.9 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 162.8 (NHCON), 160.3 (OC_{Ar}), 156.7 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 155.9 (C_{Ar}), 148.0 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 122.7 (C_{Ar}), 119.6 (CH_{Ar}), 115.1 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 66.9 (NHCOOCH₂), 46.5 (CH₂CH₂NHCON), 42.8 (OCH₂CH₂), 40.0 (CH₂NHCbz), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 35.7 (CH₂CH₂Ph), 33.5 (CH₂CH₂Ph), 29.2 (TrizCH₂CH₂), 22.5 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₃₅H₃₇N₇O₄S 651.2628; Found 651.2623 (-0.74 ppm).

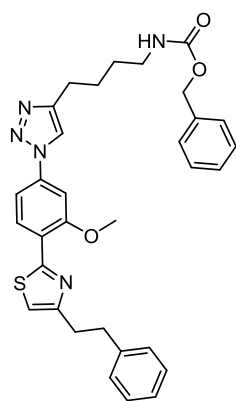
Benzyl (E)-(3-(1-(4-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propyl)carbamate (2.47)



Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.44**) (281 mg, 0.54 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**1.22**) (162 mg, 0.54 mmol) in *i*PrOH (25 mL), was stirred at 70 °C for 4 h. The final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2) to afford 210 mg (53%) of a colourless oil characterized as (**2.47**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.98 (s, 1H, Ar), 7.65 - 7.50 (m, 9H, Ar, ThiazCH=CH), 7.44 - 7.35 (m, 3H, Ar), 7.33 - 7.23 (m, 6H, Ar), 7.13 (d, J = 16.1 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 5.41 (br s, 1H, NHCbz), 5.04 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.51 (br s, 1H, NHCON), 4.38 (t, J = 5.8 Hz, 2H, OCH_2), 3.69 (t, J = 6.1 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.50 (t, J =

7.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.22 - 3.16 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$, CH_2NHCbz), 2.81 (t, J = 7.1 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.92 (quin, J = 7.3 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 162.6 (NHCON), 161.0 (OC_{Ar}), 156.2 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 153.9 (C_{Ar}), 148.0 (C_{Ar}), 140.8 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 138.7 (C_{Ar}), 136.6 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 119.7 (CH_{Ar}), 117.0 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 67.5 (OCH_2), 66.9 (NHCOOCH_2), 46.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.8 (OCH_2CH_2), 40.0 (CH_2NHCbz), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.2 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 22.5 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 725.2784; Found 725.2797 (1.69 ppm).

Benzyl (4-(1-(3-methoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl) carbamate (2.51)

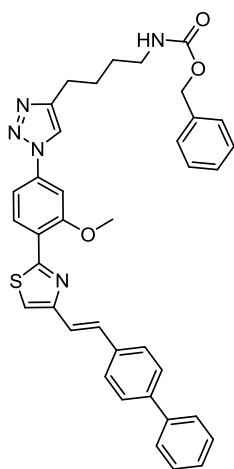


Following the general procedure of Hantzsch synthesis, a pressure flask charged with the thioamide (**2.50**) (125 mg, 0.28 mmol) and the commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (65 mg, 0.28 mmol) in *i*PrOH (15 mL), was stirred at 70 °C for 4 h. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 99:1) to yield 105 mg (63%) of a colourless oil identified as (**2.51**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.47 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.74 (s, 1H, Ar), 7.53 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.37 - 7.02 (m, 11H, Ar), 6.87 (s, 1H, Ar), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.78 (br s, 1H, NHCbz), 4.03 (s, 3H, OCH_3), 3.19 (q, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2NHCbz), 3.14 - 2.99 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.76 (t, J = 7.5 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.72 (quin, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.56 (quin, J = 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C

EXPERIMENTAL

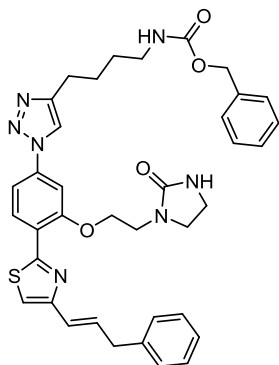
NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 160.4 (OC_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.0 (NHCOO), 148.8 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 122.7 (C_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 115.3 (CH_{Ar}), 111.9 (C_{Ar}), 103.9 (CH_{Ar}), 66.8 (NHCOOCH₂), 56.2 (OCH₃), 40.9 (CH₂NHCbz), 35.7 (CH₂CH₂Ph), 33.5 (CH₂CH₂Ph), 29.6 (CH₂CH₂NHCbz), 26.5 (TrizCH₂CH₂), 25.3 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z :** calculated for C₃₂H₃₃N₅O₃S 567.2304; Found 567.2312 (1.38 ppm).

Benzyl (4-(1-(3-methoxy-4-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.52)



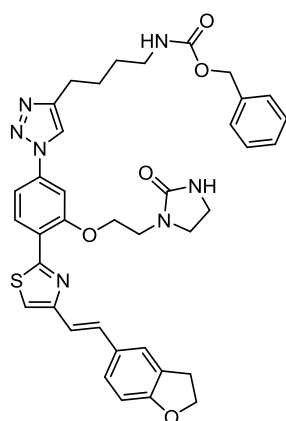
Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.50**) (292 mg, 0.66 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**1.22**) (200 mg, 0.66 mmol) in *i*PrOH (30 mL), was heated at 70 °C for 5 h. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to afford 250 mg (57%) of a yellow oil characterized as (**2.52**). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm):** 8.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.78 (s, 1H, Ar), 7.63 - 7.53 (m, 8H, Ar, ThiazCH=CH), 7.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.34 - 7.21 (m, 8H, Ar), 7.17 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 5.06 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.83 (br s, 1H, NHCbz), 4.08 (s, 3H, OCH₃), 3.22 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.76 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.59 (quin, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm):** 161.1 (NHCON), 157.4 (OC_{Ar}), 156.6 (NHCOO), 153.3 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 138.6 (CH_{Ar}), 136.7 (CH_{Ar}), 136.3 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 122.4 (C_{Ar}), 121.7 (CH_{Ar}), 119.1 (C_{Ar}), 117.2 (C_{Ar}), 111.9 (CH_{Ar}), 103.8 (CH_{Ar}), 66.7 (NHCOOCH₂), 56.2 (OCH₃), 40.9 (CH₂NHCbz), 29.6 (CH₂CH₂NHCbz), 26.5 (TrizCH₂CH₂), 25.3 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z :** calculated for C₃₈H₃₅N₅O₃S 641.2461; Found 641.2474 (2.07 ppm).

Benzyl (E)-4-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-(3-phenylprop-1-en-1-yl)thiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.65)



Following the general procedure of Hantzsch synthesis, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (250 mg, 0.47 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**2.58**) (112 mg, 0.47 mmol) in *i*PrOH (22 mL), was reacted at 70 °C for 5 h. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) to provide 153 mg (48%) of a yellow oil identified as (**2.65**). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm):** 8.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.87 (s, 1H, Ar),

7.57 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar), 7.40 - 7.18 (m, 11H, Ar), 7.10 (s, 1H, Ar), 6.86 (dt, $J = 15.5, 6.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 6.50 (dt, $J = 15.5, 1.6$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 5.05 (br s, 1H, NHCBz), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.73 (br s, 1H, NHCON), 4.41 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2), 3.75 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.61 - 3.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3.32 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.25 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2NHCBz), 2.82 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.77 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.63 (quin, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 160.6 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 153.3 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 132.6 (CH_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 126.3 (CH_{Ar}), 124.3 (CH_{Ar}), 122.5 (C_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 115.1 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH_2), 66.7 (NHCOOCH_2), 46.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.0 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCBz), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.4 ($\text{PhCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 26.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.2 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 677.2784; Found 677.2781 (-0.53 ppm).

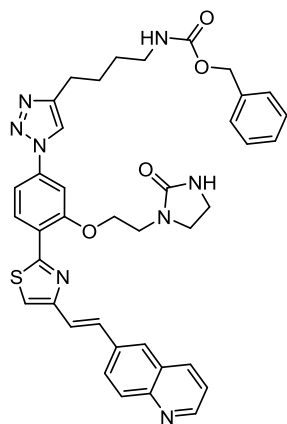
Benzyl**(*E*)-(4-(1-(4-(4-(2-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.66)**

Following the general synthetic procedure of Hantzsch cyclization, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (250 mg, 0.47 mmol) and the α -bromoketone (**2.59**) (124 mg, 0.47 mmol) in i PrOH (20 mL), was stirred at 70 °C for 5 h. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 97:3) to provide 207 mg (62%) of a yellow oil identified as (**2.66**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 7.81 (s, 1H, Ar), 7.51 (s, 1H, Ar), 7.46 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H, $\text{ThiazCH}=\text{CH}$), 7.44 - 7.15 (m, 8H, Ar), 7.12 (s, 1H, Ar), 6.92 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, $\text{ThiazCH}=\text{CH}$), 6.71 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H Ar), 5.04 (br s, 1H, NHCON), 5.03 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.68 (br s, 1H, NHCBz), 4.52 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 4.35 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2), 3.69 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.50 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.26 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.26 - 3.12 (m, 4H, CH_2NHCBz , $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.76 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.72 (quin, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.56 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 160.7 (OC_{Ar}), 160.3 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 153.8 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 131.5 (C_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 123.0 (CH_{Ar}), 122.5 (C_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 118.9 (CH_{Ar}), 115.8 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 109.5 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 71.6 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 67.8 (OCH_2), 66.8 (NHCOOCH_2), 46.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.0 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCBz), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.7 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 29.5

EXPERIMENTAL

(CH₂CH₂NHCbz), 26.4 (TrizCH₂CH₂), 25.2 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₈H₃₉N₇O₅S 705.2733; Found 705.2728 (-0.82 ppm).

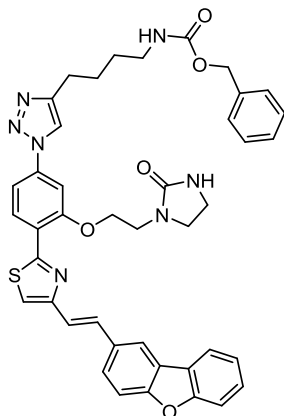
Benzyl (*E*)-(4-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-(2-(quinolin-6-yl)vinyl)thiazol-2-yl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (**2.67**)



Following the general procedure of Hantzsch synthesis, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (200 mg, 0.38 mmol) and the previously isolated without purification α -bromoketone (**2.61**) (0.38 mmol) in *i*PrOH (20 mL), was stirred at 70 °C for 6 h. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) to afford 230 mg (80%) of an orange oil identified as (**2.67**). **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.79 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, Ar), 8.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.06 (dd, *J* = 6.5, 2.2 Hz, 1H, Ar), 8.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar), 7.91 (dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.83 (s, 1H, Ar), 7.80 (s, 1H, Ar), 7.69 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H,

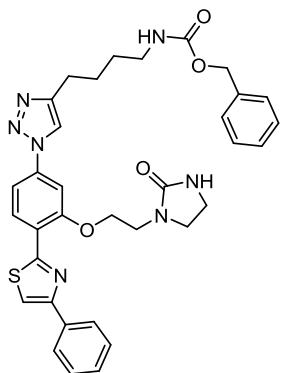
ThiazCH=CH), 7.53 (s, 1H, Ar), 7.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.34 - 7.15 (m, 8H, Ar, ThiazCH=CH), 5.06 (br s, 1H, NHCbz), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.67 (br s, 1H, NHCON), 4.37 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂), 3.71 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.52 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.20 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.77 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.72 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.57 (quin, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); **¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm)**: 162.7 (NHCON), 161.1 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.2 (C_{Ar}), 153.1 (NHCOO), 150.2 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 148.2 (C_{Ar}), 138.7 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 136.2 (CH_{Ar}), 135.5 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 122.9 (CH_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 117.8 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.7 (OCH₂), 66.8 (NHCOOCH₂), 46.4 (CH₂CH₂NHCON), 43.0 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 29.5 (CH₂CH₂NHCbz), 26.4 (TrizCH₂CH₂), 25.2 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₉H₃₈N₈O₄S 714.2737; Found 714.2734 (-0.38 ppm).

Benzyl (E)-(4-(1-(4-(4-(2-(dibenzo[*b,d*]furan-2-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.68)



Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (150 mg, 0.28 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**2.60**) (88 mg, 0.28 mmol) in *i*PrOH (20 mL), was heated to 70 °C for 5 h. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 98:2) to yield 121 mg (58%) of a colourless oil characterized as (**2.68**). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.70 (br s, 1H, NHCbz), 8.60 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H, Ar), 8.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.88 - 7.66 (m, 8H, Ar), 7.60 - 7.50 (m, 1H, Ar), 7.47 - 7.24 (m, 8H, Ar), 6.31 (br s, 1H, NHCON), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.51 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂), 3.67 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.52 (dd, *J* = 8.8, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.35 - 3.08 (m, 4H, CH₂CH₂NHCON, CH₂NHCbz), 2.76 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.72 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.54 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm): 161.9 (NHCON), 160.1 (OC_{Ar}), 155.8 (OC_{Ar}), 155.8 (OC_{Ar}), 155.0 (NHCOO), 152.6 (C_{Ar}), 147.9 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 124.0 (C_{Ar}), 123.3 (C_{Ar}), 123.0 (CH_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 120.0 (CH_{Ar}), 118.7 (CH_{Ar}), 117.4 (CH_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 111.6 (CH_{Ar}), 111.4 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.5 (OCH₂), 64.9 (NHCOOCH₂), 45.1 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 37.4 (CH₂CH₂NHCON), 28.7 (CH₂CH₂NHCbz), 25.8 (TrizCH₂CH₂), 24.5 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₄₂H₃₉N₇O₅ 753.2733; Found 753.2713 (-2.65 ppm).

Benzyl (4-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.93)

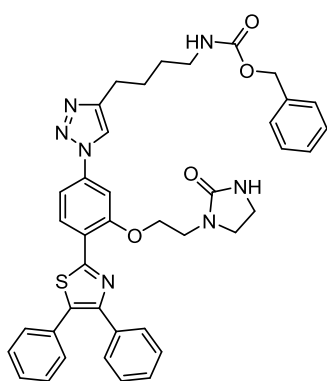


Following the general procedure of Hantzsch synthesis, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (100 mg, 0.19 mmol) and the commercially available 1-bromo-2-phenylethan-2-one (37 mg, 0.19 mmol) in *i*PrOH (15 mL), was heated at 70 °C for 3 h. After the work up, the final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to obtain 104 mg (86%) of a colourless oil characterized as (**2.93**). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.74 (s, 1H, Ar), 8.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.21 (s, 1H, Ar), 8.10 (dd, *J* = 7.7, 2.0 Hz, 2H, Ar), 8.09 (s, 1H, Ar), 7.77 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.72 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.42 - 7.24 (m, 6H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCbz), 5.01 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.50 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H,

EXPERIMENTAL

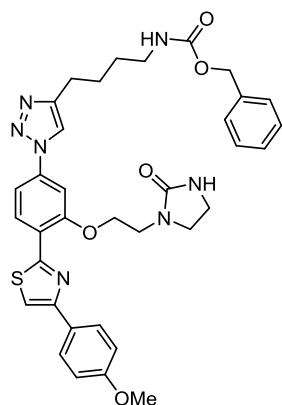
OCH₂CH₂), 3.51 (dd, *J* = 9.0, 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (dd, *J* = 9.0, 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.07 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.74 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.70 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.51 (quin, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm): 162.2 (NHCON), 162.1 (OC_{Ar}), 160.1 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 153.4 (C_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 134.1 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 126.2 (C_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 115.8 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 65.1 (NHCOOCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 28.9 (CH₂CH₂NHCbz), 26.0 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₃₄H₃₅N₇O₄S 637.2471; Found 637.2474 (0.49 ppm).

Benzyl (4-(1-(4-(4,5-diphenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.94)



Following the general procedure of Hantzsch synthesis, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (150 mg, 0.28 mmol) and the commercially available 1-bromo-1,2-diphenylethan-2-one (desyl bromide) (77 mg, 0.28 mmol) in *i*PrOH (20 mL), was heated at 70 °C for 4 h. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 97:3) to provide 191 mg (94%) of a colourless oil characterized as (**2.94**). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.89 (s, 1H, Ar), 7.64 - 7.57 (m, 3H, Ar), 7.44 - 7.23 (m, 14H, Ar), 5.19 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NHCbz), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.87 (br s, 1H, NHCON), 4.44 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, OCH₂), 3.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.57 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.29 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.84 - 1.71 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.62 (quin, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.2 (NHCON), 158.3 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 155.9 (C_{Ar}), 149.3 (C_{Ar}), 148.7 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 134.3 (C_{Ar}), 132.2 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 119.1 (CH_{Ar}), 112.4 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 67.7 (OCH₂), 66.7 (NHCOOCH₂), 46.4 (CH₂CH₂NHCON), 42.9 (OCH₂CH₂), 40.8 (CH₂NHCbz), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 29.4 (CH₂CH₂NHCbz), 26.3 (TrizCH₂CH₂), 25.2 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₄₀H₃₉N₇O₄S 713.2784; Found 713.2786 (0.23 ppm).

Benzyl (4-(1-(4-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (2.95)

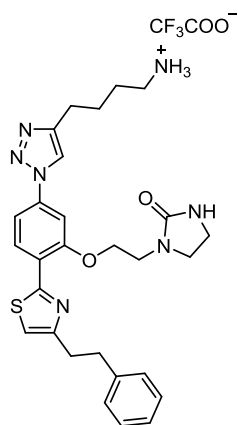


Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (204 mg, 0.38 mmol) and the commercially available 1-bromo-2-(p-methoxyphenyl)ethan-2-one (87 mg, 0.38 mmol) in *i*PrOH (18 mL) was stirred at 70 °C for 3 h. The final residue was purified by flash column chromatography ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 97:3) to provide 221 mg (85%) of a colourless oil characterized as (**2.95**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.67 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar), 7.89 (s, 1H, Ar), 7.60 (s, 1H, Ar), 7.46 (s, 1H, Ar), 7.44 - 7.20 (m, 7H, Ar), 6.99 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH_2), 5.07 (br s, 1H, NHCbz), 4.54 (br s, 1H, NHCON), 4.46 (t, J = 5.8 Hz, 2H, OCH_2), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.79 (t, J = 5.8 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.60 (dd, J = 8.9, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.34 (t, J = 8.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 3.26 (q, J = 6.6 Hz, 2H, CH_2NHCbz), 2.85 (t, J = 7.3 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.79 (quin, J = 7.4 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.67 - 1.60 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 160.5 (OC_{Ar}), 159.8 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 154.5 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 122.7 (CH_{Ar}), 119.2 (C_{Ar}), 114.2 (CH_{Ar}), 112.8 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH_2), 66.8 (NHCOOCH_2), 55.5 (OCH_3), 46.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.0 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCbz), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 26.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.3 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ 667.2577; Found 667.2557 (-3.02 ppm).

• **General procedure for catalytic hydrogenolysis and/or hydrogenation reactions²⁶**

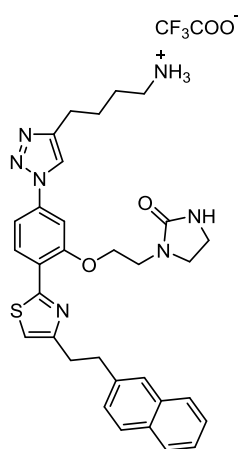
A solution of the corresponding saturated or unsaturated Cbz protected compounds (1 eq) in 1:1 mixtures of THF/MeOH and containing Pd/C (10%) (20% wt/wt), was hydrogenated (hydrogen balloon) at room temperature overnight and in the presence of TFA (0.3 - 1.5 mL). The reaction mixture was filtered (PTFE membrane filters), evaporated to dryness under reduced pressure, and co-evaporated with mixtures of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5 x 10 mL). The final residue was purified by HPFC on a SP1 Isolera Biotage using reverse phase columns (From 0% of CH_3CN to 100% of CH_3CN in 45 min) to give the final compounds as trifluoroacetate salts.

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.26)



Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(2.23)** (55 mg, 0.08 mmol), Pd/C 10 % (18 mg) and TFA (0.5 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to afford 19 mg (35%) of a colourless oil identified as **(2.26)**. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.47 (s, 1H, Ar), 8.46 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.70 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.58 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.33 - 7.17 (m, 5H, Ar), 7.15 (s, 1H, Ar), 4.48 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.74 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.60 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.36 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.15 - 3.03 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 3.00 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.87 (t, J = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.89 - 1.81 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.81 - 1.70 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 162.0 (OC_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 157.1 (C_{Ar}), 149.3 (C_{Ar}), 142.8 (C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 123.8 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 116.9 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.7 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH₂), 47.0 (CH₂CH₂NHCON), 43.9 (OCH₂CH₂), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 36.7 (CH₂CH₂Ph), 34.3 (CH₂CH₂Ph), 28.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.1 (TrizCH₂CH₂), 25.6 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 7.1 min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for C₂₈H₃₃N₇O₂S 531.2416; Found 531.2424 (1.35 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₀H₃₄F₃N₇O₄S: C. 55.80; H. 5.31; N. 15.18; S. 4.97; Found: C. 55.94; H. 5.50; N. 15.08; S. 4.51.

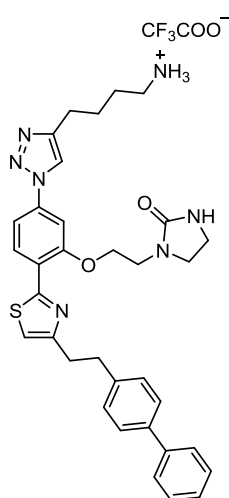
1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(2-(naphthalen-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.27)



Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of **(2.24)** (218 mg, 0.31 mmol), Pd/C 10 % (44 mg) and TFA (1.3 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase on a Biotage to yield 51 mg (24%) of **(2.27)** as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.77 (s, 1H, Ar), 8.49 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.89 - 7.66 (m, 8H, Ar, NH₃⁺), 7.52 - 7.34 (m, 3H, Ar), 7.34 (s, 1H, Ar), 4.47 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.48 (dd, J = 8.9 Hz, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.33 - 3.04 (m, 6H, CH₂CH₂NHCON, CH₂NH₃⁺, ThiazCH₂CH₂), 2.93 - 2.86 (m, 2H, ThiazCH₂CH₂), 2.77 (t, J = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.84 - 1.71 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.67 - 1.56 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 159.4 (OC_{Ar}), 155.6

(C_{Ar}), 155.3 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 139.0 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 133.2 (CH_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 125.2 (CH_{Ar}), 121.4 (CH_{Ar}), 120.4 (CH_{Ar}), 116.1 (CH_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.9 (ThiazCH₂CH₂), 32.5 (ThiazCH₂CH₂), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.7 (TrizCH₂CH₂), 24.8 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 7.8 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₂H₃₅N₇O₂S 581.2573; Found 581.2572 (-0.13 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₄H₃₆F₃N₇O₄S: C. 58.69; H. 5.22; N. 14.09; S. 4.61; Found: C. 58.20; H. 5.01; N. 14.09; S. 4.12.

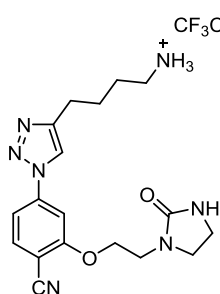
1-(2-(2-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-5-(4-(4-ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.28)



Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of **(2.25)** (50 mg, 0.07 mmol), Pd/C 10 % (10 mg) and TFA (0.5 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was subjected of hydrogenation. The final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to provide 17 mg (35%) of a colourless oil identified as **(2.28)**. **¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz) δ (ppm)**: 8.77 (s, 1H, Ar), 8.47 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.69 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.66 - 7.62 (m, 2H, Ar), 7.60 - 7.56 (m, 2H, Ar), 7.48 - 7.39 (m, 3H, Ar), 7.38 - 7.29 (m, 3H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCON), 4.47 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.63 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.21 (dd, *J* = 9.3, 6.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.17 - 2.96 (m, 4H, CH₂NH₃⁺, ThiazCH₂CH₂), 2.74 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, TrizCH₂), 2.69 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, ThiazCH₂CH₂), 1.72 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.58 - 1.42 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm)**: 162.1 (NHCON), 159.4 (OC_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 155.3 (C_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 138.0 (C_{Ar}), 137.8 (C_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 121.3 (C_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 116.0 (CH_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.4 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.7 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.3 (ThiazCH₂CH₂), 32.5 (ThiazCH₂CH₂), 30.1 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.9 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 8.4 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₄H₃₇N₇O₂S 607.2729; Found 607.2740 (1.73 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₆H₃₈F₃N₇O₄S: C. 59.91; H. 5.31; N. 13.58; S. 4.44; Found: C. 60.08; H. 5.09; N. 13.18; S. 4.20.

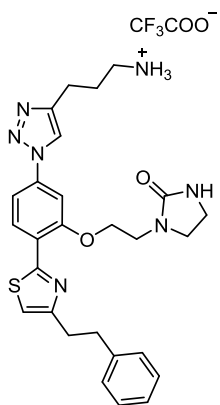
EXPERIMENTAL

4-(4-(4-Ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy) benzonitrile bis(2,2,2 trifluoroacetate) (2.30)



A solution of **(2.4)** (5 mg, 0.01 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was treated with TFA (0.3 mL) for 2 h at room temperature. Volatiles were removed and the crude was co-evaporated with mixtures of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5 x 10 mL). The final residue was purified by reverse phase semipreparative chromatography (From 0% of CH_3CN to 100% of CH_3CN) to yield 3 mg (60%) of **(2.30)** as a colourless oil. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ (ppm): 8.80 (s, 1H, Ar), 7.97 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.76 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, Ar), 7.67 (dd, $J = 8.5$, 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.40 - 6.65 (m, 3H, NH_3^+), 6.42 (br s, 1H, NHCON), 4.37 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, OCH_2), 3.55 (dd, $J = 8.9$, 6.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.50 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.25 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.82 - 2.72 (m, 4H, CH_2NH_3^+ , TrizCH_2), 1.72 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.57 (quin, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 161.1 (OC_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 141.1 (C_{Ar}), 135.4 (CH_{Ar}), 120.6 (CH_{Ar}), 115.7 (CN), 111.9 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 100.0 (C_{Ar}), 68.8 (OCH_2), 46.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2), 40.0 (CH_2NH_3^+), 37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 27.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 25.6 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 24.5 (TrizCH_2); HPLC (Gradient A, Agilent): $t_r = 4.8$ min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_2$ 369.1913; Found 369.1904 (-2.65 ppm); Elemental analysis: calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_4$: C. 49.69; H. 5.00; N. 20.28; Found: C. 49.90; H. 4.68; N. 19.84.

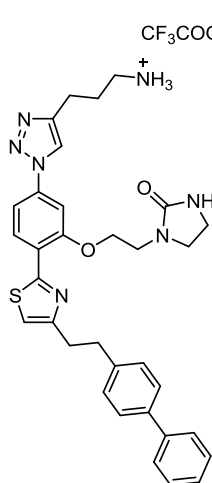
1-(2-(5-(4-(3-Ammoniopropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.35)



Following the general procedure of Cbz removal, a solution of **(2.45)** (160 mg, 0.25 mmol), Pd/C 10 % (32 mg) and TFA (1.2 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to obtain 76 mg (49%) of a colourless oil identified as **(2.35)**. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 8.47 (s, 1H, Ar), 8.46 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 7.71 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, Ar), 7.59 (dd, $J = 8.6$, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.33 - 7.17 (m, 5H, Ar), 7.15 (s, 1H, Ar), 4.49 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2), 3.75 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.60 (dd, $J = 9.3$, 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.37 (dd, $J = 9.3$, 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.18 - 3.03 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, CH_2NH_3^+), 2.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, TrizCH_2), 2.12 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 162.0 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.1 (C_{Ar}), 148.4 (C_{Ar}), 142.8 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 123.9 (C_{Ar}), 121.8 (CH_{Ar}), 117.0 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.8 (CH_{Ar}), 68.5 (OCH_2), 47.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.8 (OCH_2CH_2), 40.2 (CH_2NH_3^+), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 36.7

(CH₂CH₂Ph), 34.3 (CH₂CH₂Ph), 28.2 (CH₂CH₂NH₃⁺), 23.2 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 7.2 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₇H₃₁N₇O₂S 517.2260; Found 517.2266 (1.17 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₂₉H₃₂F₃N₇O₄S: C. 55.14; H. 5.11; N. 15.52; S. 5.08; Found: C. 54.99; H. 5.24; N. 15.09; S. 5.00.

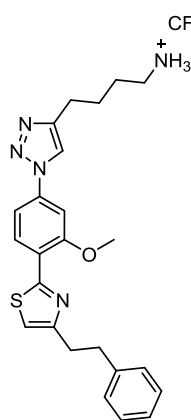
1-(2-(2-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-5-(4-(3-ammoniopropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.36)



Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of **(2.47)** (107 mg, 0.15 mmol), Pd/C 10 % (21 mg) and TFA (1 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase on a Biotage to afford 26 mg (25%) of **(2.36)** as a colourless oil. **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.77 (s, 1H, Ar), 8.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.88 - 7.55 (m, 8H, Ar), 7.53 - 7.41 (m, 2H, Ar), 7.36 - 7.31 (m, 2H, Ar), 6.40 (br s, 1H, NHCON), 4.47 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.64 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.22 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.17 - 3.03 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.93 (t, *J* = 7.5, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.83 (t, *J* = 8.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.98 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm)**: 162.2 (NHCON), 159.4 (OC_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 155.4 (C_{Ar}), 147.0 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 137.8 (C_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 121.5 (C_{Ar}), 120.6 (CH_{Ar}), 116.1 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.4 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.3 (ThiazCH₂CH₂), 32.6 (ThiazCH₂CH₂), 26.7 (CH₂CH₂NH₃⁺), 22.0 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 8.4 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₃H₃₅N₇O₂S 593.2573; Found 593.2572 (-0.09 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₅H₃₆F₃N₇O₄S: C. 59.40; H. 5.13; N. 13.85; S. 4.53; Found: C. 59.67; H. 5.41; N. 13.66; S. 4.25.

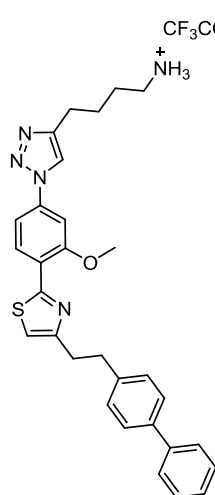
EXPERIMENTAL

4-(1-(3-Methoxy-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butan-1-ammonium 2,2,2 trifluoroacetate (**2.37**)



Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of (**2.51**) (60 mg, 0.11 mmol), Pd/C 10 % (12 mg) and TFA (0.6 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase on a Biotage to afford 15 mg (30%) of (**2.37**) as a colourless oil. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.45 (s, 1H, Ar), 8.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.67 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.55 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.36 - 7.16 (m, 5H, Ar), 7.15 (s, 1H, Ar), 4.12 (s, 3H, OCH₃), 3.20 - 3.02 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 3.00 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.87 (t, J = 7.3 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.95 - 1.85 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.84 - 1.75 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (OC_{Ar}), 158.6 (C_{Ar}), 156.8 (C_{Ar}), 149.4 (C_{Ar}), 142.8 (C_{Ar}), 139.8 (C_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 123.8 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 116.9 (CH_{Ar}), 113.2 (CH_{Ar}), 104.8 (CH_{Ar}), 56.7 (OCH₃), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 36.7 (CH₂CH₂Ph), 34.2 (CH₂CH₂Ph), 28.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.1 (TrizCH₂CH₂), 25.6 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 8.1 min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for C₂₄H₂₇N₅OS 433.1936; Found 433.1931 (-1.25 ppm); Elemental analysis: calculated for C₂₆H₂₈F₃N₅O₃S: C. 57.03; H. 5.15; N. 12.79; S. 5.85; Found: C. 57.25; H. 5.31; N. 12.61; S. 5.39.

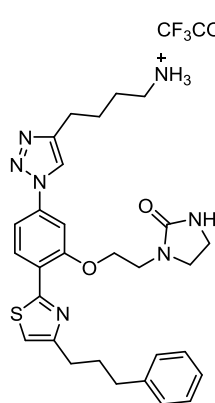
4-(1-(3-Methoxy-4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butan-1-ammonium 2,2,2 trifluoroacetate (**2.38**)



Following the general procedure of hydrogenolysis, a solution of (**2.52**) (120 mg, 0.19 mmol), Pd/C 10 % (24 mg) and TFA (1 mL) in a mixture of THF/MeOH (30 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to give 42 mg (36%) of (**2.38**) as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.76 (s, 1H, Ar), 8.48 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.82 - 7.70 (m, 3H, NH₃⁺), 7.73 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.68 - 7.61 (m, 3H, Ar), 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ar), 7.48 - 7.41 (m, 3H, Ar), 7.38 - 7.27 (m, 3H, Ar), 4.13 (s, 3H, OCH₃), 3.20 - 3.05 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.85 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.77 (t, J = 7.3 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.75 (quin, J = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.63 (quin, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 159.3 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 155.3 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 138.0 (C_{Ar}), 137.8 (C_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 121.2 (CH_{Ar}), 120.5 (CH_{Ar}), 120.4 (CH_{Ar}), 118.8 (C_{Ar}), 116.0 (CH_{Ar}), 111.9 (CH_{Ar}), 103.7 (CH_{Ar}), 56.5

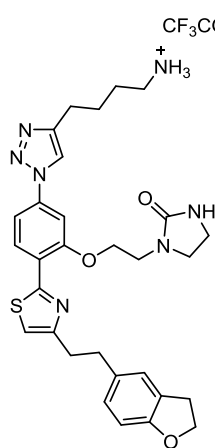
(OCH₃), 38.6 (CH₂NH₃⁺), 34.3 (ThiazCH₂CH₂), 32.6 (ThiazCH₂CH₂), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.6 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂), **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 9.6 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₀H₃₁N₅OS 509.2249; Found 509.2256 (1.37 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₂H₃₂F₃N₅O₃S: C. 61.62; H. 5.17; N. 11.23; S. 5.14; Found: C. 61.26; H. 5.08; N. 11.22; S. 5.13.

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(3-phenylpropyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.53)



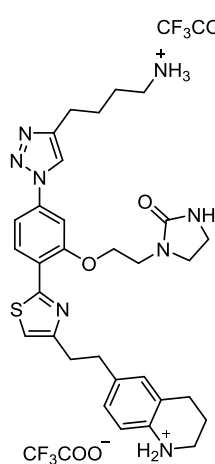
Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(2.65)** (160 mg, 0.24 mmol), Pd/C 10 % (32 mg) and TFA (1.3 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The final residue was purified by Biotage to provide 16 mg (11%) of a colourless oil identified as **(2.53)**. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.50 (s, 1H, Ar), 8.48 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.58 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.38 - 7.06 (m, 6H, Ar), 4.49 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.75 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.93 - 2.84 (m, *J* = 7.0 Hz, 4H, ThiazCH₂, CH₂Ph), 2.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂), 2.09 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, ThiazCH₂CH₂), 1.99 - 1.85 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.78 - 1.72 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm)**: 165.1 (NHCON), 162.0 (OC_{Ar}), 157.8 (C_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 149.3 (C_{Ar}), 143.4 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 126.8 (CH_{Ar}), 123.9 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 116.6 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.7 (CH_{Ar}), 68.5 (OCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 43.9 (OCH₂CH₂), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 36.4 (CH₂CH₂CH₂Ph), 32.4 (CH₂CH₂CH₂Ph), 31.7 (CH₂CH₂CH₂Ph), 28.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.1 (TrizCH₂CH₂), 25.6 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 7.7 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₉H₃₅N₇O₂S 545.2573; Found 545.2573 (0.03 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₁H₃₆F₃N₇O₄S: C. 56.44; H. 5.50; N. 14.86; S. 4.86; Found: C. 56.04; H. 5.66; N. 14.59; S. 4.48.

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(2-(2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.54)



Following the general procedure of Cbz deprotection, a solution of **(2.66)** (106 mg, 0.15 mmol), Pd/C 10 % (21 mg) and TFA (1 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to obtain 43 mg (42%) of **(2.54)** as a colourless oil. **¹H NMR (D₂O, 400 MHz, 90 °C) δ (ppm):** 8.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 8.55 (s, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.67 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.35 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.30 (s, 1H, Ar), 7.25 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 4.40 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂N), 4.17 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂Ph), 4.06 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂N), 3.92 (dd, *J* = 9.7, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.78 (dd, *J* = 9.5, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.67 (t, *J* = 8.7 Hz, OCH₂CH₂Ph), 3.48 - 3.21 (m, 8H, ThiazCH₂CH₂, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.38 - 2.26 (m, 2H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (D₂O, 100 MHz, 90 °C) δ (ppm):** 164.5 (NHCON), 160.7 (OC_{Ar}), 158.2 (OC_{Ar}), 156.3 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 149.1 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 125.3 (CH_{Ar}), 122.7 (CH_{Ar}), 120.8 (CH_{Ar}), 115.7 (C_{Ar}), 112.9 (C_{Ar}), 109.1 (CH_{Ar}), 105.2 (CH_{Ar}), 71.7 (OCH₂CH₂Ph), 68.4 (OCH₂CH₂N), 46.3 (CH₂CH₂NHCON), 43.2 (OCH₂CH₂N), 39.9 (CH₂NH₃⁺), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 34.7 (ThiazCH₂CH₂), 33.3 (ThiazCH₂CH₂), 29.8 (OCH₂CH₂Ph), 27.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.9 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** *t_r* = 7.2 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for C₃₀H₃₅N₇O₃S 573.2522; Found 573.2520 (-0.43 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₃₂H₃₆F₃N₇O₄S: C. 55.89; H. 5.28; N. 14.26; S. 4.66; Found: C. 54.96; H. 5.72; N. 13.67; S. 4.89.

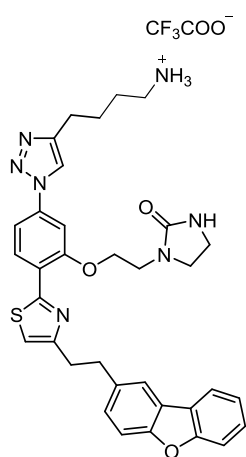
1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(2-(3,4-dihydro-2*H*-1λ²-quinolin-5-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.55)



Following the general procedure of Cbz deprotection, a solution of **(2.67)** (115 mg, 0.16 mmol), Pd/C 10 % (23 mg) and TFA (1 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was subjected of hydrogenation. The final residue was purified by reverse phase on a Biotage to give **(2.55)** as a colourless oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 8.47 (s, 1H, Ar), 8.46 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar), 7.71 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.59 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.15 (s, 1H, Ar), 6.93 - 6.82 (m, 2H, Ar), 6.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 4.49 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.75 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.27 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, PhNHCH₂), 3.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H,

ThiazCH₂CH₂), 3.03 - 2.92 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂, CH₂NH₃⁺), 2.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 2.75 (*J* = 6.5 Hz, 2H, PhNHCH₂CH₂CH₂), 1.95 (quin, *J* = 6.3 Hz, 2H, PhNHCH₂CH₂), 1.89 - 1.72 (m, 4H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 161.0 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 149.3 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 134.9 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 123.8 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 118.2 (CH_{Ar}), 116.9 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.7 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 43.8 (OCH₂CH₂), 43.8 (PhNHCH₂), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 36.0 (ThiazCH₂CH₂), 34.5 (ThiazCH₂CH₂), 28.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.5 (PhNHCH₂CH₂CH₂), 27.1 (TrizCH₂CH₂), 25.6 (TrizCH₂), 22.8 (PhNHCH₂CH₂); HPLC: (*Gradient from 2% of CH₃CN to 30% of CH₃CN, Waters*), *t_r* = 1.4 min; HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₃₁H₃₈N₈O₂S 586.2838; Found 586.2859 (3.60 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₅H₄₀F₆N₈O₆S: C. 51.59; H. 4.95; N. 13.75; S. 3.93; Found: C. 51.11; H. 4.86; N. 13.26; S. 3.56.

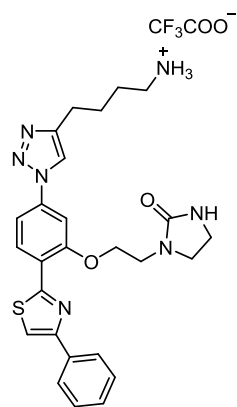
1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-(2-(dibenzo[*b,d*]furan-1-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (2.56)



Following the general synthetic procedure of hydrogenation, a solution of (**2.68**) (176 mg, 0.23 mmol), Pd/C 10 % (35 mg) and TFA (1.2 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to yield 19 mg (13%) of a colourless oil identified as (**2.56**). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.66 (s, 1H, Ar), 8.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.09 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, Ar), 8.03 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar), 7.80 - 7.30 (m, 11H, Ar, NH₃⁺), 6.18 (br s, 1H, NHCON), 4.48 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂), 3.64 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (dd, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.27 - 3.20 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.87 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.79 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.78 (quin, *J* = 7.4 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.68 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 159.4 (OC_{Ar}), 155.7 (OC_{Ar}), 155.6 (OC_{Ar}), 155.3, (NHCOO), 154.0 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 123.5 (C_{Ar}), 123.0 (CH_{Ar}), 121.4 (C_{Ar}), 121.0 (CH_{Ar}), 120.5 (CH_{Ar}), 120.4 (CH_{Ar}), 116.1 (CH_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 111.6 (CH_{Ar}), 111.2 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.7 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.7 (ThiazCH₂CH₂), 33.2 (ThiazCH₂CH₂), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.5 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂); HPLC (*Gradient A, Waters*): *t_r* = 7.0 min; HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₃₄H₃₅N₇O₃S 621.2522; Found 621.2517 (-0.78 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₆H₃₆F₃N₇O₅S: C. 58.77; H. 4.93; N. 13.33; S. 4.36; Found: C. 59.15; H. 5.09; N. 13.46; S. 4.21.

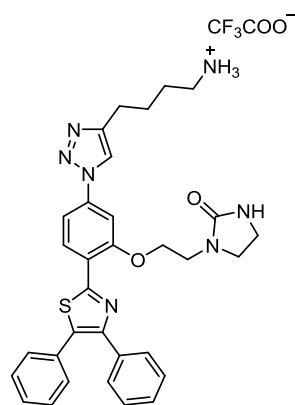
EXPERIMENTAL

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-phenylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (**2.88**)



Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of (**2.93**) (90 mg, 0.14 mmol), Pd/C 10 % (18 mg) and TFA (1 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeO (30 mL) was subjected of hydrogenation. The final residue was purified by Biotage to yield 21 mg (26%) of a colourless oil identified as (**2.88**). **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 8.64 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.46 (s, 1H, Ar), 8.54 (dd, J = 8.2, 1.3 Hz, 2H, Ar), 7.81 (s, 1H, Ar), 7.71 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.61 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.45 (dd, J = 8.3, 7.0 Hz, 2H, Ar), 7.36 (d, J = 7.4 Hz, 1H, Ar), 4.51 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.78 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.64 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.39 (dd, J = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.03 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.87 (t, J = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.92 - 1.83 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.83 - 1.73 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm):** 165.1 (NHCON), 162.0 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 149.3 (C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 123.9 (C_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 116.0 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.6 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH₂), 47.0 (CH₂CH₂NHCON), 43.9 (OCH₂CH₂), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 28.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.1 (TrizCH₂CH₂), 25.6 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** t_r = 7.5 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z :** calculated for C₂₆H₂₉N₇O₂S 503.2103; Found 503.2100 (-0.66 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₂₈H₃₀F₃N₇O₄S: C. 54.45; H. 4.90; N. 15.87; S. 5.19; Found: C. 54.66; H. 4.48; N. 15.90; S. 5.15.

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4,5-diphenylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (**2.90**)



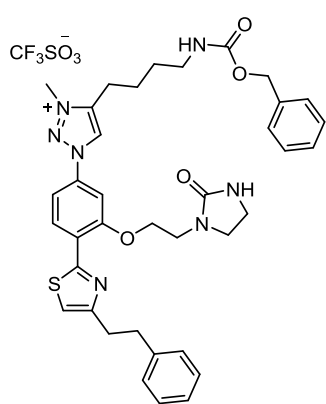
Following the general Cbz removal procedure, a solution of (**2.94**) (100 mg, 0.14 mmol), Pd/C 10 % (20 mg) and TFA (1 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase on a Biotage to provide 25 mg (26%) of (**2.90**) as a colourless oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 8.56 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.46 (s, 1H, Ar), 7.71 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar), 7.59 (dd, J = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.56 - 7.51 (m, 2H, Ar), 7.44 - 7.27 (m, 8H, Ar), 4.51 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 3.76 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.62 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.32 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.00 (q, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.86 (t, J = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.95 - 1.65 (m, 4H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm):** 165.0 (NHCON), 159.9 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 150.6 (C_{Ar}), 149.3 (C_{Ar}), 139.8 (C_{Ar}), 136.4 (C_{Ar}), 135.8 (C_{Ar}), 133.3 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}),

129.9 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 123.7 (CH_{Ar}), 121.6 (CH_{Ar}), 113.6 (CH_{Ar}), 105.6 (CH_{Ar}), 68.2 (OCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 43.9 (OCH₂CH₂), 40.4 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 28.0 (CH₂CH₂NH₃⁺), 27.1 (TrizCH₂CH₂), 25.6 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 6.4 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₂H₃₃N₇O₂S 579.2416; Found 579.242 (0.61 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₄H₃₄F₃N₇O₄S: C. 58.87; H. 4.94; N. 14.13; S. 4.62; Found: C. 59.15; H. 5.36 N. 14.62; S. 5.03.

- **General procedure of triazole alkylation (Chapter - 2)**

To a solution of the corresponding triazole (1 eq) in dry CH₂Cl₂, methyl trifluoromethanesulfonate or ethyl trifluoromethanesulfonate (1 eq) were added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min under argon atmosphere. Then, the reaction was quenched with MeOH (10 mL) and H₂O (5 mL), and evaporated to dryness. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (eluents are specified in each case).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium, trifluoromethanesulfonate (2.69)



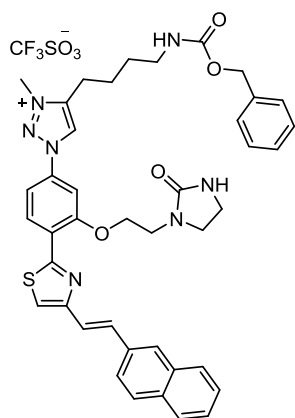
Following the general procedure of alkylation, a solution of triazole (**2.23**) (150 mg, 0.23 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (25 μ L, 0.23 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) to provide 159 mg (85%) of (**2.69**) as a yellow oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 9.24 (s, 1H, Ar), 8.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.70 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.74 - 7.08 (m, 11H, Ar), 5.07 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.35 (s,

3H, CH₃), 3.75 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.60 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.36 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 3.18 - 3.02 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 3.00 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.91 (quin, *J* = 6.9 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.70 (quin, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm)**: 165.0 (NHCON), 160.9 (OC_{Ar}), 159.0 (C_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 146.9 (C_{Ar}), 146.8 (C_{Ar}), 142.7 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 131.0 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 117.9 (CH_{Ar}), 114.7 (CH_{Ar}), 107.1 (CH_{Ar}), 68.6 (OCH₂), 67.4 (NHCOOCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 43.6 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 38.4 (CH₃), 36.6 (CH₂CH₂Ph), 34.3 (CH₂CH₂Ph), 30.1 (CH₂CH₂NHCbz), 24.8 (TrizCH₂CH₂), 23.8

EXPERIMENTAL

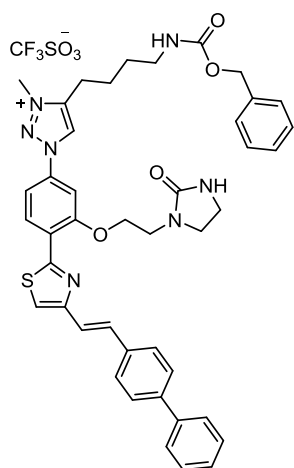
(TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₇H₄₂N₇O₄S 680.3019; Found 680.3019 (0.01 ppm).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1-(4-(4-(2-(naphthalen-2-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.70)



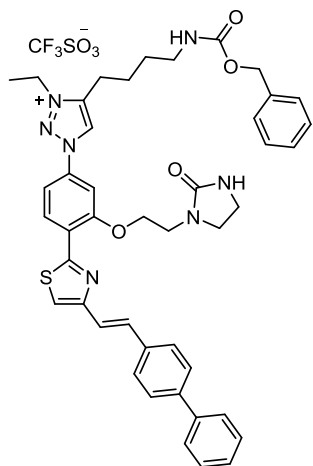
Following the general alkylation procedure, a solution of triazole **(2.24)** (67 mg, 0.09 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (11 μ L, 0.09 mmol). After working up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) affording 68 mg (82%) of a yellow oil identified as **(2.70)**. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 8.99 (s, 1H, Ar), 8.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.85 - 7.77 (m, 3H, Ar), 7.73 (s, 1H, Ar), 7.64 (t, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.54 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.49 - 7.41 (m, 3H, Ar, ThiazCH=CH), 7.41 - 7.25 (m, 6H, Ar), 7.14 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 5.11 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.41 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, OCH₂), 4.06 (s, 3H, CH₃), 3.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.65 (dd, *J* = 9.3, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.42 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.18 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.49 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.69 - 1.48 (m, 4H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NHCbz); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm)**: 165.1 (NHCON), 160.9 (OC_{Ar}), 159.1 (C_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 154.5 (C_{Ar}), 146.6 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 135.9 (CH_{Ar}), 135.0 (C_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 131.8 (CH_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 124.3 (CH_{Ar}), 123.4 (CH_{Ar}), 122.7 (CH_{Ar}), 119.7 (CH_{Ar}), 114.0 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 68.3 (OCH₂), 67.4 (NHCOOCH₂), 47.0 (CH₂CH₂NHCON), 43.8 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 39.4 (CH₂CH₂NHCON), 38.2 (CH₃), 30.2 (CH₂CH₂NHCbz), 24.6 (TrizCH₂CH₂), 23.7 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₄₁H₄₂N₇O₄S 728.3019; Found 728.3022 (0.39 ppm).

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.71**)**



Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.25**) (90 mg, 0.12 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (12 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (14 μL , 0.12 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 94:6) to provide 77 mg (70%) of (**2.71**) as a yellow oil. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 9.54 (s, 1H, Ar), 8.70 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.90 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.86 (s, 1H, Ar), 7.79 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.75 - 7.65 (m, 6H, Ar), 7.59 (d, J = 16.1 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 7.48 (t, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.43 - 7.24 (m, 8H, Ar, ThiazCH=CH), 6.44 (br s, 1H, NHCON), 5.03 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.52 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2), 4.35 (s, 3H, CH_3), 3.68 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.52 (dd, J = 8.9, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.25 (t, J = 7.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.12 (q, J = 6.5 Hz, 2H, CH_2NHCbz), 2.94 (t, J = 7.6 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.78 (quin, J = 7.6 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.62 (quin, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 162.2 (NHCON), 159.4 (OC_{Ar}), 156.2 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 152.9 (C_{Ar}), 145.1 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 137.2 (CH_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 123.8 (CH_{Ar}), 121.7 (CH_{Ar}), 119.6 (CH_{Ar}), 113.3 (CH_{Ar}), 106.0 (CH_{Ar}), 68.1 (OCH_2), 65.3 (NHCOOCH_2), 45.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2), 37.9 (CH_2NHCbz), 37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 28.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 23.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 22.3 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{43}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 754.3176; Found 754.3197 (2.81 ppm).

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-ethyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.72**)**

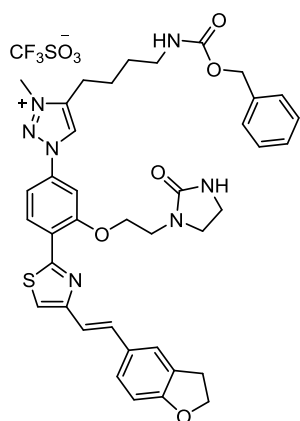


Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.25**) (100 mg, 0.14 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (13 mL) was treated with ethyl trifluoromethanesulfonate (23 μL , 0.18 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 94:6) to obtain 56 mg (45%) of (**2.72**) as a yellow oil. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 9.20 (s, 1H, Ar), 8.66 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.79 - 7.54 (m, 9H, Ar, ThiazCH=CH), 7.52 - 7.40 (m, 3H, Ar), 7.39 - 7.24 (m, 5H, Ar), 7.22 (d, J = 16.0 Hz, 1H,

EXPERIMENTAL

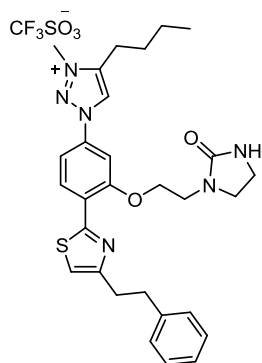
ThiazCH=CH), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.62 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.51 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 3.78 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.68 (dd, *J* = 9.3, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.40 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.89 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.84 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.72 - 1.62 (m, 5H, CH₂CH₂NHCbz, CH₂CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 161.2 (OC_{Ar}), 159.1 (C_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 154.9 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 141.6 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 137.5 (C_{Ar}), 137.4 (C_{Ar}), 131.8 (C_{Ar}), 131.3 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 122.4 (CH_{Ar}), 119.5 (CH_{Ar}), 114.6 (CH_{Ar}), 106.8 (CH_{Ar}), 68.5 (OCH₂), 67.4 (NHCOOCH₂), 47.0 (CH₂CH₂NHCON), 43.7 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 30.2 (CH₂CH₂NHCbz), 25.0 (TrizCH₂CH₂), 23.7 (TrizCH₂), 14.2 (CH₃); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₄₄H₄₆N₇O₄S 768.3332; Found 768.3329 (-0.44 ppm).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1-(4-(4-(2-(2,3-dihydrobenzofuran-6-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (**2.73**)



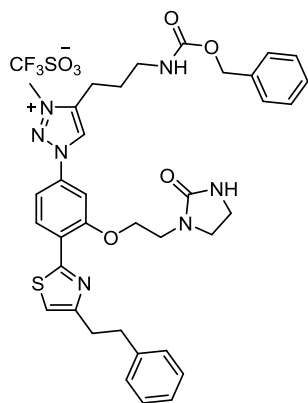
Following the general procedure of alkylation, a solution of triazole (**2.66**) (142 mg, 0.20 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (14 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (23 μL, 0.20 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4) to give 149 mg (85%) of (**2.73**) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 9.09 (s, 1H, Ar), 8.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.40 - 7.20 (m, 7H, Ar, ThiazCH=CH), 7.15 - 7.07 (m, 3H, Ar), 6.75 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, ThiazCH=CH), 6.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H Ar), 5.89 (br s, 1H, NHCbz), 5.25 (br s, 1H, NHCON), 5.05 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.56 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H, OCH₂CH₂Ph), 4.16 - 4.12 (m, 2H, OCH₂), 4.00 (s, 3H, CH₃), 3.65 - 3.55 (m, 2H, OCH₂CH₂), 3.47 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.35 - 3.27 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 - 3.12 (m, 4H, CH₂NHCbz, OCH₂CH₂Ph), 2.57 - 2.49 (m, 2H, TrizCH₂), 1.76 - 1.67 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.58 - 1.51 (m, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 163.0 (NHCON), 160.3 (OC_{Ar}), 159.0 (OC_{Ar}), 156.9 (C_{Ar}), 155.5 (C_{Ar}), 153.3 (C_{Ar}), 145.5 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 130.6 (C_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 124.0 (C_{Ar}), 123.0 (CH_{Ar}), 122.4 (CH_{Ar}), 119.2 (CH_{Ar}), 118.5 (CH_{Ar}), 117.3 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 109.3 (CH_{Ar}), 104.1 (CH_{Ar}), 71.7 (OCH₂CH₂Ph), 66.8 (OCH₂), 66.5 (NHCOOCH₂), 45.6 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 41.1 (CH₃), 40.1 (CH₂NHCbz), 38.4 (CH₂CH₂NHCON), 29.5 (OCH₂CH₂Ph), 29.4 (CH₂CH₂NHCbz), 23.6 (TrizCH₂CH₂), 23.1 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₃₉H₄₂N₇O₅S 720.2968; Found 720.2998 (4.18 ppm).

4-(4-butyl-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium, trifluoromethanesulfonate (2.74)



Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.33**) (141 mg, 0.27 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (16 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (31 μL , 0.27 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 93:7) to afford 129 mg (70%) of a yellow oil identified as (**2.74**). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz, 50 $^\circ\text{C}$) δ (ppm): 9.17 (s, 1H, Ar), 8.58 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.83 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.55 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.36 - 7.04 (m, 5H, Ar), 6.98 (s, 1H, Ar), 4.62 (br s, 1H, NHCON), 4.52 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH_2), 4.33 (s, 3H, Triz CH_3), 3.74 (t, J = 6.0 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.55 (dd, J = 9.1, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.34 (dd, J = 8.7, 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.25 - 3.03 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.95 (t, J = 7.8 Hz, 2H, Triz CH_2), 1.93 - 1.70 (m, 2H, Triz CH_2CH_2), 1.49 (sex, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz, 50 $^\circ\text{C}$) δ (ppm): 162.8 (NHCON), 159.3 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.4 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 135.6 (C_{Ar}), 130.3 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.2 (C_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 116.4 (CH_{Ar}), 113.4 (CH_{Ar}), 106.5 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH_2), 46.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.1 (OCH_2CH_2), 38.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.1 (Triz CH_3), 35.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 33.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 29.2 (Triz CH_2CH_2), 23.5 (Triz CH_2), 22.4 (CH_2CH_3), 13.5 (CH_3); HPLC ($\text{G}_{\text{B}1}$): t_r = 8.2 min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}$ 531.2542; Found 531.2536 (-1.24 ppm); Elemental analysis: calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$: C. 52.93; H. 5.18; N. 12.35; S. 9.42; Found: C. 53.45; H. 5.37; N. 11.90; S. 9.24.

4-(3-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)propyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.75)

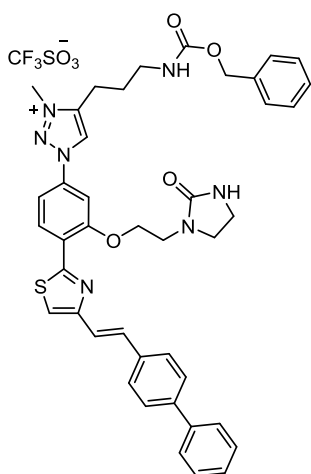


Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.45**) (187 mg, 0.29 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (18 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (33 μL , 0.29 mmol). After working up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to yield 182 mg (78%) of (**2.75**) a yellow oil. $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 9.28 (s, 1H, Ar), 8.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.80 (d, J = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.70 (dd, J = 8.7, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.36 - 7.08 (m, 11H, Ar), 5.07 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.51 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2), 4.32 (s, 3H, CH_3), 3.75 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.60 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.39 - 3.28 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$, CH_2NHCBz), 3.18 - 3.04 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 3.00 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Triz CH_2),

EXPERIMENTAL

2.08 (quin, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 165.6 (NHCON), 160.9 (OC_{Ar}), 159.1 (C_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.3 (NHCOO), 146.6 (C_{Ar}), 142.7 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 117.9 (CH_{Ar}), 114.7 (CH_{Ar}), 107.1 (CH_{Ar}), 68.6 (OCH_2), 67.6 (NHCOOCH $_2$), 46.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.6 (OCH_2CH_2), 40.4 (CH_2NHCbz), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.4 (CH_3), 36.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 34.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 24.8 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 21.6 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 666.2862; Found 666.2873 (1.59 ppm).

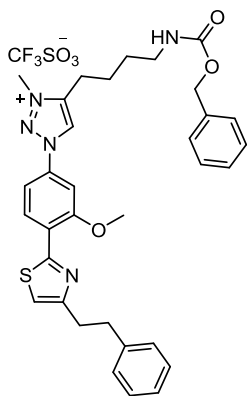
(E)-1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(3-(((benzyloxy)carbonyl)amino)propyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.76)



Following the general procedure of alkylation, a solution of triazole **(2.47)** (111 mg, 0.15 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (17 μL , 0.15 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to provide 115 mg (85%) of a yellow oil identified as **(2.76)**. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 9.56 (s, 1H, Ar), 8.71 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 8.01 - 7.68 (m, 9H, Ar), 7.60 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, ThiazCH=CH), 7.52 - 7.25 (m, 9H, Ar, ThiazCH=CH), 6.43 (br s, 1H, NHCON), 5.04 (s, 2H, NHCOOCH $_2$), 4.52 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, OCH_2), 4.32 (s, 3H, CH_3), 3.68 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.52 (dd, $J = 9.0, 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.27 -

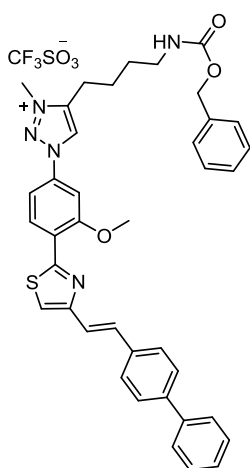
3.16 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$, CH_2NHCbz), 2.94 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.96 (quin, $J = 7.3$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 159.4 (OC_{Ar}), 156.3 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 152.9 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 135.8 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 123.8 (CH_{Ar}), 119.6 (CH_{Ar}), 113.3 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 68.1 (OCH_2), 65.4 (NHCOOCH $_2$), 45.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2), 39.9 (CH_2NHCbz), 37.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 26.6 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 20.3 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 740.3019; Found 740.3023 (0.51 ppm).

1-(4-(4-phenethylthiazol-2-yl)-3-methoxyphenyl)-4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.77)



Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.51**) (105 mg, 0.19 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (21 μL , 0.19 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) providing 103 mg (76%) of a yellow oil identified as (**2.77**). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 9.54 (s, 1H, Ar), 8.59 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.75 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.49 (s, 1H, Ar), 7.42 - 7.13 (m, 11H, Ar, NHCBz), 5.03 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.35 (Triz CH_3), 4.16 (s, 3H, OCH_3), 3.23 - 3.01 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, CH_2NHCBz), 2.96 (t, J = 7.7 Hz, 2H, Triz CH_2), 1.79 (quin, J = 7.8 Hz, 2H, Triz CH_2CH_2), 1.61 (quin, J = 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 158.5 (OC_{Ar}), 156.5 (C_{Ar}), 156.2 (C_{Ar}), 155.8 (NHCOO), 145.1 (C_{Ar}), 141.3 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 117.0 (CH_{Ar}), 113.4 (CH_{Ar}), 105.4 (CH_{Ar}), 65.2 (NHCOOCH_2), 56.9 (OCH_3), 39.7 (CH_2NHCBz), 37.9 (Triz CH_3), 34.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 32.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 23.4 (Triz CH_2CH_2), 22.2 (Triz CH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ 582.2539; Found 582.2566 (4.66 ppm).

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-methoxyphenyl)-4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.78)

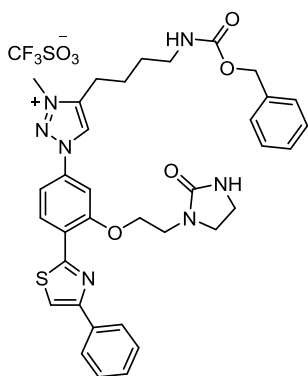


Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.52**) (125 mg, 0.20 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (22 μL , 0.20 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 94:6) to give 123 mg (78%) of a yellow oil identified as (**2.78**). ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 9.14 (s, 1H, Ar), 8.56 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.68 - 7.49 (m, 9H, Ar, Thiaz $\text{CH}=\text{CH}$), 7.44 (t, J = 7.7 Hz, 2H, Ar), 7.39 - 7.24 (m, 7H, Ar), 7.14 (d, J = 16.0 Hz, 1H, Thiaz $\text{CH}=\text{CH}$), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.22 (s, 3H, Triz CH_3), 4.12 (s, 3H, OCH_3), 3.19 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH_2NHCBz), 2.77 (t, J = 7.9 Hz, 2H, Triz CH_2), 1.77 (quin, J = 7.8 Hz, 2H, Triz CH_2CH_2), 1.63 (quin, J = 7.1 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 161.1 (NHCON), 159.0 (OC_{Ar}), 158.0 (NHCOO), 154.7 (C_{Ar}), 146.8 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 141.4 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 137.4 (CH_{Ar}), 137.2 (CH_{Ar}), 131.6 (CH_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.1

EXPERIMENTAL

(CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 127.0 (C_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 122.3 (C_{Ar}), 119.6 (C_{Ar}), 114.0 (CH_{Ar}), 105.5 (CH_{Ar}), 66.7 (NHCOOCH₂), 56.2 (OCH₃), 40.9 (CH₂NHCbz), 29.6 (CH₂CH₂NHCbz), 26.5 (TrizCH₂CH₂), 25.3 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₉H₃₈N₅O₃S 656.2695; Found 656.2711 (2.44 ppm).

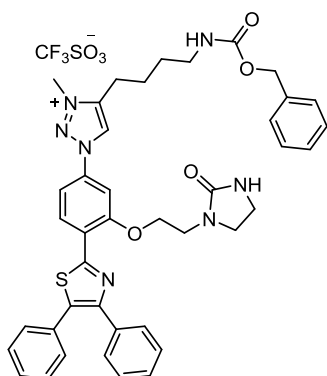
4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium, trifluoromethanesulfonate (**2.96**)



Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (**2.93**) (92 mg, 0.14 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (13 mL), was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (16 μ L, 0.14 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10) to yield 93 mg (81%) of (**2.96**) as a yellow oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 9.14 (s, 1H, Ar), 8.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar), 8.00 (dt, *J* = 6.5, 1.4 Hz, 2H, Ar), 7.92 (s, 1H, Ar), 7.69 - 7.61 (m, 2H, Ar), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.38 - 7.21 (m, 6H, Ar), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.47 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 4.28

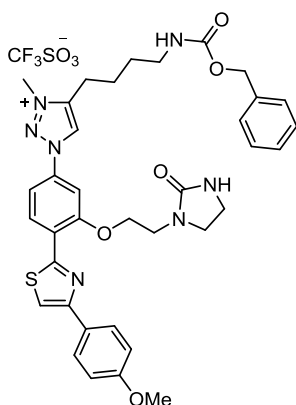
(s, 3H, CH₃), 3.76 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.62 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.40 (dd, *J* = 9.2, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.90 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.84 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.71 (quin, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); **¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm)**: 165.1 (NHCON), 161.0 (OC_{Ar}), 159.1 (C_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 146.8 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 135.6 (CH_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 116.9 (CH_{Ar}), 114.4 (CH_{Ar}), 106.5 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH₂), 67.4 (NHCOOCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 43.7 (OCH₂CH₂), 40.9 (CH₂NHCbz), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 38.4 (CH₃), 30.2 (CH₂CH₂NHCbz), 24.8 (TrizCH₂CH₂), 23.8 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₅H₃₈N₇O₄S 652.2706; Found 652.2713 (1.04 ppm).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1-(4-(4,5-diphenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.97)



Following the general procedure of alkylation, a solution of triazole (**2.94**) (90 mg, 0.13 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (11 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (14 μL , 0.13 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 93:7) to afford 96 mg (87%) of a yellow oil identified as (**2.97**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 9.24 (s, 1H, Ar), 8.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar), 7.76 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar), 7.56 - 7.49 (m, 3H, Ar), 7.33 - 7.13 (m, 12H, Ar), 5.62 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NHCbz), 4.99 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.74 (br s, 1H, NHCON), 4.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2), 4.18 (s, 3H, CH_3), 3.64 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.45 (dd, $J = 9.1, 6.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.26 - 3.17 (m, 4H, CH_2NHCbz , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.81 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.93 - 1.83 (m, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.64 - 1.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.9 (NHCON), 157.2 (OC_{Ar}), 157.1 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 149.7 (C_{Ar}), 146.0 (C_{Ar}), 136.9 (C_{Ar}), 135.5 (C_{Ar}), 135.0 (C_{Ar}), 132.0 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 113.0 (CH_{Ar}), 105.7 (CH_{Ar}), 67.3 (OCH_2), 66.6 (NHCOOCH_2), 46.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.7 (OCH_2CH_2), 40.0 (CH_2NHCbz), 38.4 (CH_3), 38.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 23.8 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 23.2 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 728.3019; Found 728.3048 (3.91 ppm).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1-(4-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (2.98)



Following the general procedure of alkylation, a solution of triazole (**2.95**) (125 mg, 0.19 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (21 μL , 0.19 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 91:9) to yield 117 mg (75 %) of a yellow oil identified as (**2.98**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 9.11 (s, 1H, Ar), 8.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar), 7.74 (s, 1H, Ar), 7.63 - 7.58 (m, 2H, Ar), 7.38 - 7.25 (m, 5H, Ar), 6.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar), 5.08 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.45 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2), 4.27 (s, 3H, TrizCH_3), 3.85 (s, 3H, OMe), 3.75 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.62

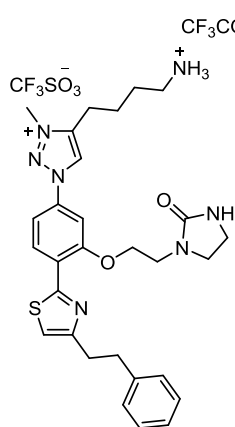
EXPERIMENTAL

(dd, $J = 9.3, 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.39 (dd, $J = 9.2, 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.24 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2NHCBz), 2.87 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.82 (quin, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.70 (quin, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 165.0 (NHCON), 161.3 (OC_{Ar}), 160.7 (C_{Ar}), 159.0 (C_{Ar}), 157.1 (C_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 146.8 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 136.9 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.1 (C_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 114.2 (CH_{Ar}), 106.3 (CH_{Ar}), 68.3 (OCH_2), 67.4 (NHCOOCH_2), 55.9 (OCH_3), 46.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.7 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCBz), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.3 (TrizCH_3), 30.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 24.8 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 23.8 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ 682.2812; Found 682.2809 (-0.32 ppm).

• General procedure for catalytic hydrogenolysis and/or hydrogenation reactions²⁶

A solution of the corresponding saturated or unsaturated alkylated and protected compounds (1 eq) in 1:1 mixtures of THF/MeOH and containing Pd/C (10%) (20% wt/wt), was hydrogenated (hydrogen balloon) at room temperature overnight and in the presence of TFA (0.3 - 1.0 mL). The reaction mixture was filtered (PTFE membrane filters), washed with MeOH and CH_2Cl_2 , and evaporated to dryness under reduced pressure. The final residue was purified by HPFC on a SP1 Isolera Biotage using reverse phase columns (From 0% of CH_3CN to 100% of CH_3CN in 30 min) to give the final compounds as double salts of trifluoroacetate and trifluoromethanesulfonate.

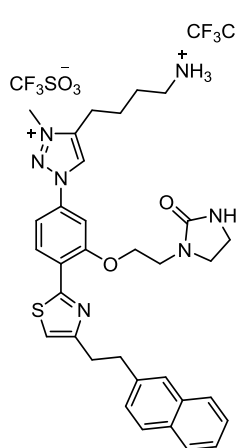
4-(4-Ammoniobutyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (**2.79**)



Following the general procedure of Cbz removal, a solution of (**2.69**) (88 mg, 0.11 mmol), Pd/C 10 % (18 mg) and TFA (0.7 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was hydrogenated. The final residue was purified by reverse phase on a Biotage to yield 31 mg (36%) of a yellow oil identified as (**2.79**). ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ (ppm): 9.32 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar), 7.72 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, Ar), 7.35 - 6.98 (m, 6H, Ar), 4.54 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH_2), 4.40 (s, 3H, CH_3), 3.76 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.58 (dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.39 (dd, $J = 9.2, 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.21 - 2.99 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$, CH_2NH_3^+ , TrizCH_2), 2.03 - 1.92 (m, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.93 - 1.77 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 160.0 (C_{Ar}), 157.7 (C_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 142.8 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 131.2 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 123.4 (C_{Ar}), 117.9 (CH_{Ar}), 114.9 (CH_{Ar}), 107.4 (CH_{Ar}), 68.7 (OCH_2), 47.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.8 (OCH_2CH_2), 40.3 (CH_2NH_3^+), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.5 (CH_3), 36.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 34.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 27.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 24.8

(TrizCH₂CH₂), 23.8 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 6.7 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₉H₃₆N₇O₂S 546.2651; Found 546.2660 (1.59 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₂H₃₇F₆N₇O₇S₂: C. 47.46; H. 4.61; N. 12.11; S. 7.92; Found: C. 47.84; H. 4.73; N. 12.05; S. 7.53.

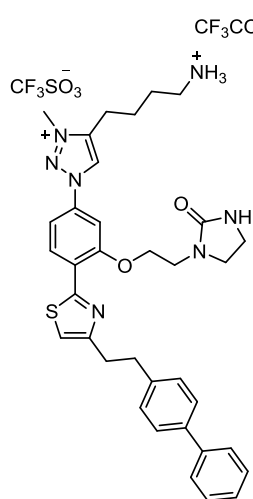
4-(4-Ammoniobutyl)-3-methyl-1-(4-(4-(2-(naphthalen-2-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.80)



Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of **(2.70)** (160 mg, 0.18 mmol), Pd/C 10 % (32 mg) and TFA (1.0 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to provide 78 mg (50%) of **(2.80)** a yellow oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm)**: 9.26 (s, 1H, Ar), 8.58 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.86 - 7.66 (m, 5H, Ar), 7.62 (s, 1H, Ar), 7.46 - 7.30 (m, 3H, Ar), 7.22 (s, 1H, Ar), 4.50 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 4.38 (s, 3H, CH₃), 3.73 (t, J = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.56 (dd, J = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.35 - 3.26 (m, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.24 - 3.22 (m, 4H ThiazCH₂CH₂), 3.09 - 3.00 (m, 4H, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.12 - 1.92 (m, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.90 - 1.79 (m, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm)**: 165.0 (NHCON), 160.9 (OC_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 157.3 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 140.3 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 133.6 (CH_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 118.0 (CH_{Ar}), 114.8 (CH_{Ar}), 107.2 (CH_{Ar}), 68.6 (OCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 43.6 (OCH₂CH₂), 40.2 (CH₂NH₃⁺), 39.2 (CH₂CH₂NHCON), 38.5 (CH₃), 36.7 (ThiazCH₂CH₂), 34.0 (ThiazCH₂CH₂), 27.8 (CH₂CH₂NH₃⁺), 24.6 (TrizCH₂CH₂), 23.8 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: t_r = 7.1 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₃H₃₈N₇O₂S 596.2808; Found 596.2787 (-3.4 ppm); **Elemental analysis**: calculated for C₃₆H₃₉F₆N₇O₇S₂: C. 50.29; H. 4.57; N. 11.40; S. 7.46; Found: C. 50.05; H. 5.08; N. 10.92; S. 7.83.

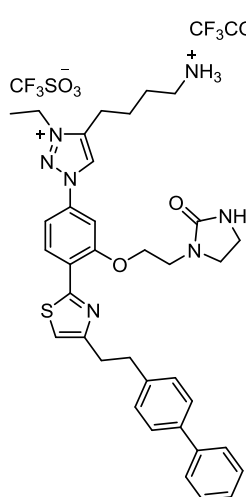
EXPERIMENTAL

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-ammoniobutyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (**2.81**)



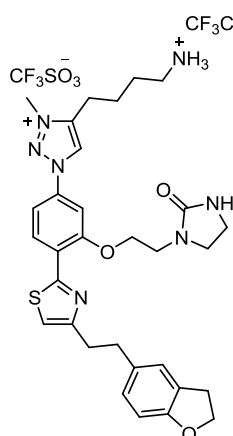
Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of (**2.71**) (148 mg, 0.2 mmol), Pd/C 10 % (30 mg) and TFA (1 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase on a Biotage to give 53 mg (31%) of (**2.81**) as a yellow oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 9.28 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.82 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.71 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.60 - 7.54 (m, 2H, Ar), 7.52 - 7.49 (m, 2H, Ar), 7.46 - 7.37 (m, 2H, Ar), 7.33 - 7.22 (m, 4H, Ar), 4.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.39 (s, CH₃), 3.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.60 (dd, *J* = 9.1, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.35 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.27 - 3.09 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 3.09 - 3.02 (m, 4H, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.02 - 1.85 (m, 4H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm):** 165.1 (NHCON), 160.9 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 146.3 (C_{Ar}), 142.3 (C_{Ar}), 141.9 (C_{Ar}), 140.2 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 120.2 (CH_{Ar}), 118.0 (CH_{Ar}), 114.8 (CH_{Ar}), 107.2 (CH_{Ar}), 68.6 (OCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 43.6 (OCH₂CH₂), 40.2 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 38.5 (CH₃), 36.2 (CH₂CH₂Ph), 34.1 (CH₂CH₂Ph), 27.9 (CH₂CH₂NH₃⁺), 24.7 (TrizCH₂CH₂), 23.7 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** *t_r* = 7.7 min; **HRMS (ES, positive mode) *m/z*:** calculated for C₃₅H₄₀N₇O₂S 622.2964; Found 622.2952 (-2.02 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₃₈H₄₁F₆N₇O₇S₂: C. 51.52; H. 4.67; N. 11.07; S. 7.24; Found: C. 51.88; H. 5.25; N. 10.78; S. 7.61.

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-ammoniobutyl)-3-ethyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.82)



Following the general procedure of Cbz hydrogenolysis, a solution of **(2.72)** (85 mg, 0.09 mmol), Pd/C 10 % (17 mg) and TFA (0.7 mL) in THF/MeOH 1:1 (20 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to afford 22 mg (27%) of **(2.82)** as a yellow oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 9.26 (s, 1H, Ar), 8.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.72 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.55 - 7.50 (m, 2H, Ar), 7.49 - 7.44 (m, 2H, Ar), 7.43 - 7.39 (m, 2H, Ar), 7.35 - 7.25 (m, 4H, Ar), 4.74 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 4.55 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.77 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.33 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.27 - 3.12 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 3.12 - 3.04 (m, 4H, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.06 - 1.85 (m, 4H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NH₃⁺), 1.74 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm):** 165.1 (NHCON), 161.0 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 145.9 (C_{Ar}), 142.3 (C_{Ar}), 141.9 (C_{Ar}), 140.2 (C_{Ar}), 137.4 (C_{Ar}), 131.1 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 118.0 (CH_{Ar}), 114.9 (CH_{Ar}), 107.2 (CH_{Ar}), 68.6 (OCH₂), 46.9 (CH₂CH₂NHCON), 43.6 (OCH₂CH₂), 40.2 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 36.3 (CH₂CH₂Ph), 34.2 (CH₂CH₂Ph), 27.9 (CH₂CH₂NH₃⁺), 24.9 (TrizCH₂CH₂), 23.7 (TrizCH₂), 14.1 (CH₃); **HPLC (Gradient A, Agilent):** *t_r* = 7.8 min; **HRMS (ES, positive mode) *m/z*:** calculated for C₃₆H₄₂N₇O₂S 636.3121; Found 636.3132 (1.71 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₃₉H₄₃F₆N₇O₇S₂: C. 52.05; H. 4.82; N. 10.90; S. 7.13; Found: C. 51.86; H. 4.87; N. 10.50; S. 7.26.

4-(4-Ammoniobutyl)-1-(4-(4-(2-(2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.83)

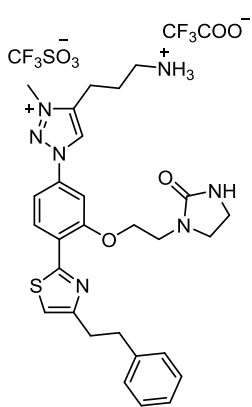


Following the general Cbz removal procedure, a solution of **(2.73)** (140 mg, 0.16 mmol), Pd/C 10 % (28 mg) and TFA (1.0 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was hydrogenated. The final residue was purified by HPFC on a Biotage to yield 62 mg (45%) of a yellow oil identified as **(2.83)**. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm):** 9.54 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.75 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.65 (br s, 3H, NH₃⁺), 7.48 (s, 1H, Ar), 7.13 (s, 1H, Ar), 6.94 (dd, *J* = 8.1, 1.9 Hz, 1H, Ar), 6.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar),

EXPERIMENTAL

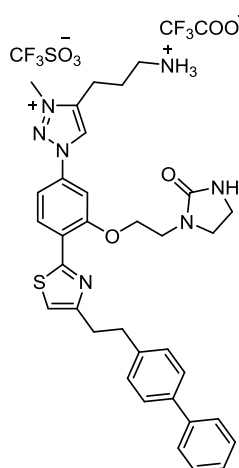
6.41 (br s, 1H, NHCON), 4.56 - 4.41 (m, 4H, OCH₂CH₂N, OCH₂CH₂Ph), 4.37 (s, 3H, CH₃), 3.66 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂N), 3.50 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.13 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, OCH₂CH₂Ph), 3.08 - 2.72 (m, 8H, ThiazCH₂CH₂, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 1.82 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.71 (quin, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.2 (NHCON), 158.5 (OC_{Ar}), 157.9 (OC_{Ar}), 156.0 (C_{Ar}), 155.5 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 135.5 (C_{Ar}), 133.1 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 125.5 (C_{Ar}), 124.2 (CH_{Ar}), 122.3 (CH_{Ar}), 119.1 (C_{Ar}), 117.1 (C_{Ar}), 113.4 (C_{Ar}), 108.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 70.7 (OCH₂CH₂Ph), 68.1 (OCH₂CH₂N), 45.4 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂N), 38.4 (CH₃), 37.9 (CH₂NH₃⁺), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 34.3 (ThiazCH₂CH₂), 33.2 (ThiazCH₂CH₂), 29.2 (OCH₂CH₂Ph), 26.3 (CH₂CH₂NH₃⁺), 23.0 (TrizCH₂CH₂), 22.0 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 6.6 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₃₁H₃₈N₇O₃S 588.2757; Found 588.2765 (1.4 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₄H₃₉F₆N₇O₈S₂: C. 47.94; H. 4.61; N. 11.51; S. 7.53; Found: C. 47.57; H. 4.85; N. 11.16; S. 7.46.

4-(3-Ammoniopropyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.84)



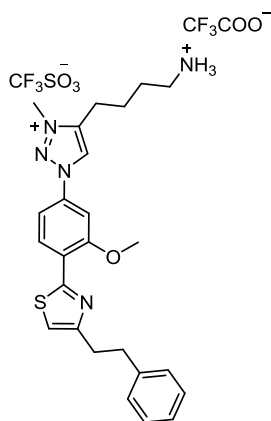
Following the general procedure of Cbz deprotection, a solution of (2.75) (182 mg, 0.22 mmol), Pd/C 10 % (36 mg) and TFA (1.0 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (35 mL) was hydrogenated. The final residue was purified by HPFC on a Biotage to afford 60 mg (34%) of (2.84) as a yellow oil. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 9.29 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.72 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.31 - 6.92 (m, 6H, Ar), 4.54 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.41 (s, 3H, CH₃), 3.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.61 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.22 - 2.92 (m, 8H, CH₂CH₂Ph, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.25 (quin, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (CD₃OD, 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 160.0 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 145.5 (C_{Ar}), 142.7 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.0 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 118.0 (CH_{Ar}), 114.9 (CH_{Ar}), 107.3 (CH_{Ar}), 68.6 (OCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 43.6 (OCH₂CH₂), 39.7 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 38.6 (CH₃), 36.6 (CH₂CH₂Ph), 34.3 (CH₂CH₂Ph), 25.7 (TrizCH₂CH₂), 21.5 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 6.5 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₂₈H₃₄N₇O₂S 532.2495; Found 532.2500 (1.07 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₁H₃₅F₆N₇O₇S₂: C. 46.79; H. 4.43; N. 12.32; S. 8.06; Found: C. 46.86; H. 4.87; N. 12.35; S. 8.05.

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(3-ammoniopropyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.85)



Following the general hydrogenation procedure, a solution of **(2.76)** (115 mg, 0.13 mmol), Pd/C 10 % (23 mg) and TFA (0.8 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to provide 10 mg (10%) of **(2.85)** as a yellow oil identified. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm):** 9.52 (s, 1H, Ar), 8.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.81 - 7.68 (m, 3H, Ar), 7.66 - 7.54 (m, 4H, Ar), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar), 7.42 - 7.17 (m, 2H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCON), 4.50 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.35 (s, 3H, CH₃), 3.66 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.50 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (dd, *J* = 8.9, 6.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.09 - 2.95 (m, 8H, ThiazCH₂CH₂, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.04 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm):** 162.2 (NHCON), 158.5 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 155.5 (C_{Ar}), 143.9 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 137.8 (C_{Ar}), 135.6 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.7 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 124.2 (C_{Ar}), 122.0 (CH_{Ar}), 119.4 (CH_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 68.1 (OCH₂), 45.5 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.0 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 37.6 (CH₃), 34.3 (CH₂CH₂Ph), 32.5 (CH₂CH₂Ph), 24.2 (TrizCH₂CH₂), 19.9 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** *t*_r = 7.6 min; **HRMS (ES, positive mode) *m/z*:** calculated for C₃₄H₃₈N₇O₂S 608.2808; Found 608.2814 (0.99 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₃₇H₃₉F₆N₇O₇S₂: C. 50.97; H. 4.51; N. 11.25; S. 7.35; Found: C. 50.32; H. 4.83; N. 11.38; S. 7.34.

4-(4-Ammoniobutyl)-3-methyl-1-(3-methoxy-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.86)

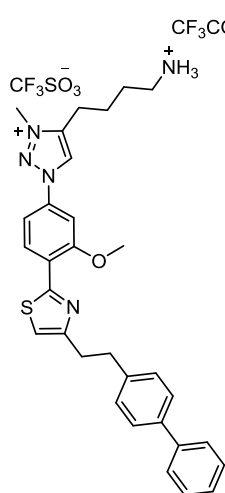


Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(2.77)** (100 mg, 0.14 mmol), Pd/C 10 % (20 mg) and TFA (0.8 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase on a Biotage to obtain 18 mg (19%) of a yellow oil identified as **(2.86)**. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm):** 9.55 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.75 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.80 - 7.59 (br s, 3H, NH₃⁺), 7.51 (s, 1H, Ar), 7.32 - 7.15 (m, 5H, Ar), 4.37 (TrizCH₃), 4.16 (s, 3H, OCH₃), 3.16 - 3.02 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 2.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.89 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.83

EXPERIMENTAL

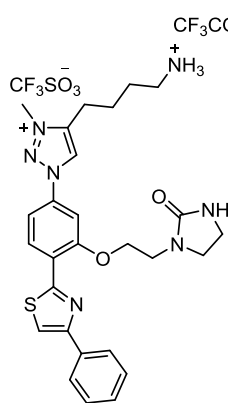
(quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.71 (quin, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR (**DMSO- d_6** , 100 MHz) δ (ppm): 158.4 (OC_{Ar}), 156.5 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 141.3 (C_{Ar}), 135.6 (C_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 125.9 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 122.3 (CF_3SO_3^-), 119.1 (CF_3COO^-), 117.1 (CH_{Ar}), 113.4 (CH_{Ar}), 105.4 (CH_{Ar}), 56.9 (OCH_3), 38.3 (CH_2NH_3^+), 38.0 (TrizCH_3), 34.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 32.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 26.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 22.9 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 22.0 (TrizCH_2); **HPLC (Gradient A, Agilent)**: $t_r = 7.1$ min; **HRMS (ES, positive mode) m/z** : calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{OS}$ 448.2171; Found 448.2179 (1.78 ppm); **Elemental analysis**: calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$: C. 47.25; H. 4.39; N. 9.84; S. 9.01; Found: C. 47.45; H. 3.94; N. 10.00; S. 9.02.

4-(4-Ammoniobutyl)-3-methyl-1-(3-methoxy-4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)thiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (**2.87**)



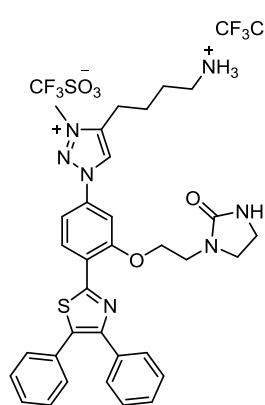
Following the general procedure of hydrogenation, a solution of (**2.78**) (100 mg, 0.12 mmol), Pd/C 10 % (20 mg) and TFA (0.9 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to yield 28 mg (29%) of (**2.87**) as a yellow oil. ^1H NMR (**DMSO- d_6** , 400 MHz) δ (ppm): 9.58 (s, 1H, Ar), 8.62 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 7.85 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar), 7.84 - 7.75 (m, 3H, NH_3^+), 7.76 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H, Ar), 7.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, Ar), 7.59 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ar), 7.55 (s, 1H, Ar), 7.45 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, Ar), 7.38 - 7.31 (m, 3H, Ar), 4.37 (s, 3H, TrizCH_3), 4.17 (s, 3H, OCH_3), 3.23 - 3.06 (m, 4H, $\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$), 2.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2NH_3^+), 2.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.84 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.72 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); ^{13}C NMR (**DMSO- d_6** , 100 MHz) δ (ppm): 158.5 (OC_{Ar}), 156.5 (C_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 137.8 (C_{Ar}), 135.6 (C_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 122.3 (CF_3SO_3^-), 119.1 (CF_3COO^-), 117.2 (CH_{Ar}), 113.4 (CH_{Ar}), 105.4 (CH_{Ar}), 56.9 (OCH_3), 38.3 (CH_2NH_3^+), 37.9 (TrizCH_3), 34.3 ($\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$), 32.5 ($\text{ThiazCH}_2\text{CH}_2$), 26.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 22.9 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 22.0 (TrizCH_2); **HPLC (Gradient A, Waters)**: $t_r = 6.3$ min; **HRMS (ES, positive mode) m/z** : calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{OS}$ 524.2484; Found 524.2489 (0.91 ppm); **Elemental analysis**: calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{F}_6\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$: C. 51.84; H. 4.48; N. 8.89; S. 8.14; Found: C. 52.00; H. 4.22; N. 8.76; S. 8.63.

4-(4-Ammoniobutyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.89)



Following the general hydrogenolysis procedure, a solution of **(2.96)** (78 mg, 0.10 mmol), Pd/C 10 % (17 mg) and TFA (0.7 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to afford 19 mg (25%) of **(2.89)** as a yellow oil. **¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm):** 9.27 (s, 1H, Ar), 8.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, Ar), 7.97 (s, 1H, Ar), 7.81 (s, 1H, Ar), 7.73 (dd, *J* = 8.2, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.57 - 7.19 (m, 3H, Ar), 4.56 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 4.38 (s, 3H, CH₃), 3.80 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.65 (dd, *J* = 9.2, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.40 (dd, *J* = 9.3, 6.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.11 - 2.99 (m, 4H, CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.05 - 1.86 (m, 4H, TrizCH₂CH₂, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm):** 165.1 (NHCON), 161.1 (OC_{Ar}), 157.5 (C_{Ar}), 156.1 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 131.2 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 117.0 (CH_{Ar}), 114.8 (CH_{Ar}), 107.0 (CH_{Ar}), 68.5 (OCH₂), 46.8 (CH₂CH₂NHCON), 43.7 (OCH₂CH₂), 40.2 (CH₂NH₃⁺), 39.3 (CH₂CH₂NHCON), 38.5 (CH₃), 27.9 (CH₂CH₂NH₃⁺), 24.7 (TrizCH₂CH₂), 23.8 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** *t_r* = 6.6 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for C₂₇H₃₂N₇O₂S 518.2338; Found 518.2354 (3.1 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₃₀H₃₃F₆N₇O₇S₂: C. 46.09; H. 4.26; N. 12.54; S. 8.20; Found: C. 46.31; H. 4.38; N. 12.76; S. 8.24.

4-(4-Ammoniobutyl)-1-(4-(4,5-diphenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (2.91)

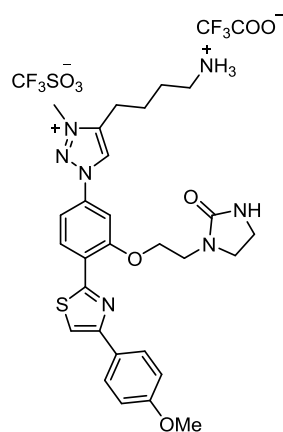


Following the general procedure of Cbz removal, a solution of **(2.97)** (96 mg, 0.11 mmol), Pd/C 10 % (19 mg) and TFA (0.9 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was subjected of hydrogenation. The final residue was purified by Biotage providing 15 mg (16%) of a yellow oil identified as **(2.91)**. **¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ (ppm):** 9.28 (s, 1H, Ar), 8.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.73 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.59 - 7.53 (m, 2H, Ar), 7.45 - 7.25 (m, 8H, Ar), 4.58 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.39 (s, 3H, CH₃), 3.78 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.63 (dd, *J* = 9.1, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.37 (dd, *J* = 9.0, 7.2 Hz, CH₂CH₂NHCON), 3.12 - 3.00 (m, 4H, TrizCH₂, CH₂NH₃⁺), 1.99 (quin, *J* = 8.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.94 - 1.84 (m, 2H,

EXPERIMENTAL

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$; ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ (ppm): 165.0 (NHCON), 159.0 (OC_{Ar}), 157.4 (C_{Ar}), 151.0 (C_{Ar}), 146.5 (C_{Ar}), 137.5 (CH_{Ar}), 136.8 (CH_{Ar}), 136.2 (CH_{Ar}), 133.1 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 130.7 (CH_{Ar}), 130.2 (CH_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 114.9 (CH_{Ar}), 107.2 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH_2), 46.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.7 (OCH_2CH_2), 40.2 (CH_2NH_3^+), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.5 (CH_3), 27.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 24.7 (Triz CH_2CH_2), 23.8 (Triz CH_2); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 7.2 min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_2\text{S}$ 594.2651; Found 594.2649 (-0.43 ppm); Elemental analysis: calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2$: C. 50.40; H. 4.35; N. 11.43; S. 7.47; Found: C. 49.86; H. 4.31; N. 11.63; S. 7.36.

4-(4-Ammoniobutyl)-1-(4-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1H-1,2,3-triazol-3-ium **2,2,2-trifluoroacetate**
trifluoromethanesulfonate (2.92)

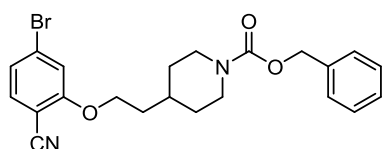


Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(2.98)** (101 mg, 0.12 mmol), Pd/C 10 % (20 mg) and TFA (0.9 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to obtain 27 mg (27%) of **(2.92)** as a yellow oil. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 9.07 (s, 1H, Ar), 8.50 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.83 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar), 7.66 (s, 1H, Ar), 7.59 - 7.47 (m, 2H, Ar), 6.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar), 4.38 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2), 4.23 (s, 3H, Triz CH_3), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.67 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.53 (dd, J = 9.3, 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.30 (dd, J = 9.0, 6.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 2.97 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2NH_3^+), 2.87 (t, J = 7.5 Hz, 2H, Triz CH_2), 1.90 - 1.71 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$, Triz CH_2CH_2); ^{13}C NMR (CD_3OD , 75 MHz) δ (ppm): 165.1 (NHCON), 161.3 (OC_{Ar}), 160.7 (C_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 155.7 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 130.9 (C_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.2 (C_{Ar}), 115.7 (CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 114.4 (CH_{Ar}), 106.5 (CH_{Ar}), 68.4 (OCH_2), 55.9 (OCH_3), 46.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.6 (OCH_2CH_2), 40.2 (CH_2NH_3^+), 39.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 38.4 (Triz CH_3), 27.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 24.6 (Triz CH_2CH_2), 23.8 (Triz CH_2); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 6.1 min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_3\text{S}$ 548.2444; Found 548.2439 (-0.88 ppm); Elemental analysis: calculated for $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$: C. 45.87; H. 4.35; N. 12.08; S. 7.90; Found: C. 45.88; H. 4.40; N. 12.11; S. 7.99.

E1.8. Synthesis and characterization of triazole structures of Chapter - 3

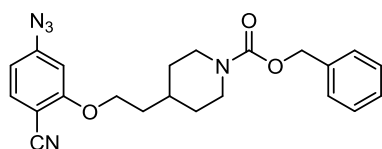
- Synthesis of piperidine derivatives

Benzyl 4-(2-(5-bromo-2-cyanophenoxy)ethyl)piperidine-1-carboxylate (**3.1**)²⁰



A solution of 4-bromo-2-fluorobenzonitrile (51 mg, 0.25 mmol) and benzyl 4-(2-hydroxyethyl)piperidine-1-carboxylate (100 mg, 0.38 mmol) and in anhydrous THF (10 mL), was treated with a 0.5 M solution of KHMDS in toluene (0.86 mL, 0.43 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. After concentration under reduced pressure, the crude was diluted with CH₂Cl₂ (20 mL) and washed with HCl 0.1 N (2 x 15 mL), H₂O (1 x 15 mL) and brine (1 x 15 mL). The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated to dryness. The final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 70:30) to afford 125 mg (94%) of (**1**) as a colourless oil. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.40 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.38 - 7.22 (m, 5H, Ar), 7.15 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.11 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, Ar), 5.12 (s, 2H, NCOOCH₂), 4.23 - 4.19 (m, 2H, H'HCN(Cbz)CHH'), 4.10 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, OCH₂), 2.83 - 2.79 (m, 2H, H'HCN(Cbz)CHH'), 1.88 - 1.64 (m, 5H, CH, CH(CHH')₂), OCH₂CH₂), 1.24 - 1.18 (m, 2H, CH(CHH')₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 161.0 (NCOO), 155.3 (OC_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 134.5 (CH_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 124.3 (CH_{Ar}), 116.1 (CH_{Ar}), 115.8 (CN), 101.2 (C_{Ar}), 67.1 (NCOOCH₂), 67.0 (OCH₂), 44.1 (H'HCN(Cbz)CHH'), 35.3 (OCH₂CH₂), 32.8 (CH), 32.0 (CH(CHH')₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₂₂H₂₃BrN₂O₃ 442.0892; Found 442.0900 (1.92 ppm).

Benzyl 4-(2-(5-azido-2-cyanophenoxy)ethyl)piperidine-1-carboxylate (**3.2**)

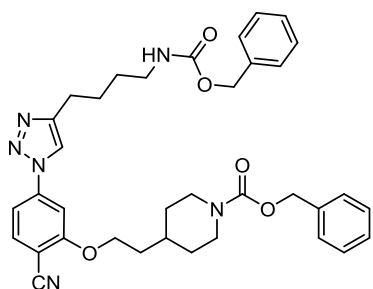


A flask charged with the bromoarene (**3.1**) (600 mg, 1.36 mmol) and NaN₃ (1.30 g, 20.4 mmol) in anhydrous DMSO (25 mL) under argon atmosphere and in the presence of molecular sieves (4 Å), was heated at 100 °C for 72 h. After cooling to room temperature, crude was diluted with H₂O (50 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 40 mL). Organic layers were washed with H₂O (1 x 60 mL) and brine (1 x 40 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated under reduced pressure. The final residue was purified by flash column chromatography (hexane/AcOEt, 80:20) to obtain 270 mg (49%) of a colourless oil identified as (**3.2**). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 7.35 - 7.16 (m, 5H, Ar), 6.61 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, Ar), 6.44 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 5.05 (s, 2H, NCOOCH₂), 4.12 - 4.06 (m, 2H, H'HCN(Cbz)CHH'), 4.02 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, OCH₂), 2.76 - 2.72 (m, 2H, H'HCN(Cbz)CHH'), 1.78 - 1.56 (m, 5H, CH, CH(CHH')₂), OCH₂CH₂), 1.22 - 1.14 (m, 2H, CH(CHH')₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm): 162.0 (NCOO), 159.3 (N₃C_{Ar}), 155.3 (OC_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 135.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 111.4 (CN), 103.2

EXPERIMENTAL

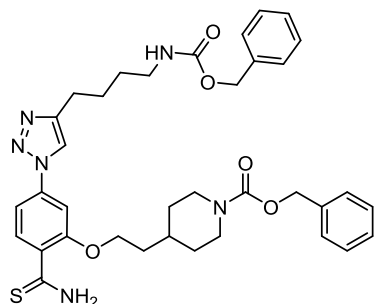
(CH_{Ar}), 98.5 (C_{Ar}), 67.1 (NCOOCH₂), 66.8 (OCH₂), 44.1 (H'HCN(Cbz)CHH'), 35.3 (OCH₂CH₂), 32.8 (CH), 32.0 (CH(CHH')₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₂₂H₂₃N₅O₃ 405.1801; Found 405.1814 (3.22 ppm).

Benzyl 4-(1-(5-(4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-cyanophenoxy)ethyl)piperidine-1-carboxylate (3.3)



The azide (**3.2**) (270 mg, 0.67 mmol) was treated with benzyl 5-hexynylcarbamate (211 mg, 0.87 mmol) and CuSO₄·5H₂O (17 mg, 0.07 mmol) in EtOH (15 mL). Sodium ascorbate (53 mg, 0.27 mmol) and H₂O (15 mL) were subsequently added and the reaction was stirred overnight at room temperature in darkness. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (20 mL), washed with H₂O (2 x 20 mL) and brine (1 x 20 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated. The final residue was purified by flash column chromatography (CH₂Cl₂/MeOH, 100:1) to give 205 mg (48%) of (**3.3**) as a colourless oil. **¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm)**: 7.84 (s, 1H, Ar), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar), 7.58 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.46 - 7.22 (m, 10H, Ar), 7.24 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H, Ar), 5.15 (s, 2H, NCOOCH₂), 5.11 (s, 2H, NCOOCH₂), 4.90 (br s, 1H, NHCbz), 4.25 - 4.19 (m, 2H, H'HCN(Cbz)CHH'), 4.25 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, OCH₂), 3.27 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.92 - 2.75 (m, 4H, TrizCH₂, H'HCN(Cbz)CHH'), 1.95 - 1.73 (m, 7H, TrizCH₂CH₂, CH, CH(CHH')₂), OCH₂CH₂), 1.67 - 1.60 (m, 2H, CH₂CH₂NHCbz), 1.29 - 1.20 (m, 2H, CH(CHH')₂); **¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ (ppm)**: 161.8 (OC_{Ar}), 156.6 (NCOO), 155.6 (NCOO), 149.2 (C_{Ar}), 141.4 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 136.6 (C_{Ar}), 135.1 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 119.0 (CH_{Ar}), 115.5 (CN), 111.4 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 101.9 (C_{Ar}), 67.3 (NCOOCH₂), 67.1 (NCOOCH₂), 66.7 (OCH₂), 44.2 (H'HCN(Cbz)CHH'), 40.9 (CH₂NHCbz), 35.3 (OCH₂CH₂), 32.8 (CH), 32.1 (CH(CHH')₂), 29.5 (CH₂CH₂NHCbz), 26.3 (TrizCH₂CH₂), 25.1 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₃₆H₄₀N₆O₅ 636.3060; Found 636.3060 (-0.1 ppm).

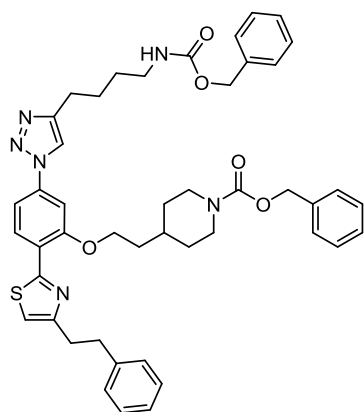
Benzyl 4-(1-(5-(4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-carbamothioylphenoxy)ethoxy)piperidine-1-carboxylate (3.4)



A solution of $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ 20% aq (1.5 mL, 21.9 mmol) was added over the benzonitrile (**3.3**) (200 mg, 0.31 mmol) dissolved in DMF (15 mL) and then, reaction mixture was heated to 80 °C for 4 h. After cooling to room temperature, CH_2Cl_2 (30 mL) was added and the resulting organic layer was washed with HCl 0.1 N (3 x 20 mL), dried (Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100:5)

to provide 144 mg (80%) of a yellow oil characterized as (**3.4**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.86 (br s, 1H, SCNH_2), 8.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar), 8.11 (br s, 1H, SCNH_2), 7.76 (s, 1H, Ar), 7.53 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.38 - 7.17 (m, 10H, Ar), 7.13 (dd, $J = 8.7, 2.0$ Hz, 1H, Ar), 5.05 (s, 2H, NCOOCH_2), 5.02 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.84 (br s, 1H, NHCbz), 4.20 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, OCH_2), 4.19 - 4.08 (m, 2H, $\text{H}'\text{HCN}(\text{Cbz})\text{CHH}'$), 3.18 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2NHCbz), 2.77 - 2.65 (m, 4H, TrizCH_2 , $\text{H}'\text{HCN}(\text{Cbz})\text{CHH}'$), 1.82 - 1.61 (m, 7H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$, CH, $\text{CH}(\text{CHH}')_2$, OCH_2CH_2), 1.59 - 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 1.25 - 1.02 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CHH}')_2$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 197.9 (SCNH_2), 156.5 (NCOO), 155.3 (NCOO), 149.1 (C_{Ar}), 140.5 (C_{Ar}), 137.9 (CH_{Ar}), 136.9 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 124.9 (C_{Ar}), 119.0 (CH_{Ar}), 111.4 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.8 (NHCOOCH_2), 67.2 (NCOOCH_2), 66.7 (OCH_2), 44.1 ($\text{H}'\text{HCN}(\text{Cbz})\text{CHH}'$), 40.8 (CH_2NHCbz), 35.6 (OCH_2CH_2), 33.2 (CH), 32.1 ($\text{CH}(\text{CHH}')_2$), 29.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 26.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.2 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ 670.2937; Found 670.2931 (-0.92 ppm).

Benzyl 4-(2-(5-(4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)piperidine-1-carboxylate (3.5)



A pressure flask charged with the thioamide (**3.4**) (144 mg, 0.22 mmol) was reacted with the commercially available 1-bromo-4-phenylbutan-2-one (49 mg, 0.22 mmol) in $i\text{PrOH}$ (15 mL) at 70 °C for 3 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 98:2) to afford 167 mg (96%) of a colourless oil characterized as (**3.5**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 7.73 (s, 1H, Ar), 7.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.35 - 7.03 (m, 16H, Ar), 6.86 (s, 1H, Ar), 5.05 (s, 2H, NCOOCH_2), 5.02 (s, 2H, NCOOCH_2),

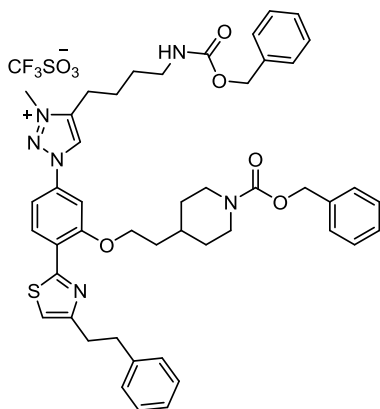
4.77 (br s, 1H, NHCbz), 4.25 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, OCH₂), 4.19 - 4.05 (m, 2H, H'HCN(Cbz)CHH'), 3.19 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂NHCbz), 3.14 - 3.01 (m, 4H, CH₂CH₂Ph), 2.78 - 2.65 (m, 4H, TrizCH₂, H'HCN(Cbz)CHH'), 1.88 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 1.82 - 1.66 (m, 5H, TrizCH₂CH₂, CH, CH(CHH')₂), 1.61 - 1.48 (m, 2H, CH₂CH₂NHCbz), 1.24 - 1.10 (m, 2H, CH(CHH')₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 160.4 (C_{Ar}), 156.5 (NCOO), 156.4 (NCOO), 156.0 (C_{Ar}), 155.4 (OC_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 126.1 (CH_{Ar}), 122.7 (C_{Ar}), 119.0 (CH_{Ar}), 115.2 (CH_{Ar}), 111.8 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 67.1 (NHCOOCH₂), 67.1 (NCOOCH₂), 66.8 (OCH₂), 44.3 (H'HCN(Cbz)CHH'), 40.9 (CH₂NHCbz), 35.7 (OCH₂CH₂), 35.6 (CH₂CH₂Ph), 33.5 (CH), 33.1 (CH₂CH₂Ph), 32.1 (CH(CHH')₂), 29.6 (CH₂CH₂NHCbz), 26.6 (TrizCH₂CH₂), 25.3 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₄₆H₅₀N₆O₅S 798.3563; Found 798.3571 (0.90 ppm).

CC1=CC=C(C=C1)CCc2nc(s2)c3ccc(cc3N4C=CN=C4)OCCN5CCCC[NH+]5.[CF3-].[O-]C(F)(F)F

A solution of **(3.5)** (80 mg, 0.10 mmol), Pd/C 10 % (16 mg) and TFA (0.8 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was subjected of hydrogenation. After filtration (PTFE membrane filters), the reaction mixture was evaporated and subsequently co-evaporated with mixtures of CH₂Cl₂/MeOH (5 x 10 mL). The final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to yield 32 mg (43%) of **(3.6)** as a colourless oil. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8.49 (s, 1H, Ar), 8.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar), 7.73 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.56 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.33 - 7.18 (m, 5H, Ar), 7.16 (s, 1H, Ar), 4.43 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, OCH₂), 3.41 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H,

274

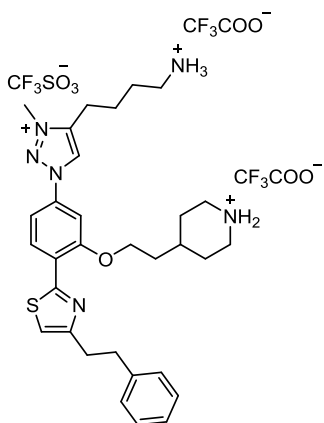
4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-1-(3-(2-(1-((benzyloxy)carbonyl)piperidin-4-yl)ethoxy)-4-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (3.7**)**



Triazole (**3.5**) (90 mg, 0.11 mmol) dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (13 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (13 μL , 0.11 mmol) at room temperature for 15 min under argon atmosphere. The reaction mixture was quenched with MeOH (5 mL) and H_2O (5 mL) and concentrated to dryness. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to obtain 85 mg (80%) of a yellow oil identified as (**3.7**). **^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm):** 9.24 (s, 1H, Ar), 8.53 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.66 (s, 1H, Ar), 7.45 (dd, J = 8.7, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.36 - 7.05 (m, 15H, Ar), 6.88 (s, 1H, Ar), 5.54 (t, J = 5.9 Hz, 1H, NHCbz), 5.05 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.99 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.27 (t, J = 6.4 Hz, 2H, OCH_2), 4.19 - 4.05 (m, 5H, CH_3 , $\text{H}'\text{HCN}(\text{Cbz})\text{CHH}'$), 3.19 (q, J = 6.4 Hz, 2H, CH_2NHCbz), 3.12 - 2.98 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2.87 (t, J = 7.9 Hz, 2H, TrizCH_2), 2.71 (t, J = 11.9 Hz, 2H, $\text{H}'\text{HCN}(\text{Cbz})\text{CHH}'$), 1.90 - 1.68 (m, 7H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$, CH , $\text{CH}(\text{CHH}')_2$, OCH_2CH_2), 1.64 - 1.53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 1.24 - 1.06 (m, 2H, $\text{CH}(\text{CHH}')_2$); **^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm):** 159.3 (OC_{Ar}), 157.1 (NCOO), 156.7 (NCOO), 156.3 (C_{Ar}), 155.4 (C_{Ar}), 145.9 (C_{Ar}), 141.6 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 135.4 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 116.4 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 105.5 (CH_{Ar}), 68.3 (NHCooCH_2), 67.1 (NCOOCH_2), 66.6 (OCH_2), 44.3 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{Cbz})\text{CH}_2$), 39.8 (CH_2NHCbz), 37.9 (TrizCH_3), 35.7 (OCH_2CH_2), 35.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 33.4 (CH), 33.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$), 32.1 ($\text{CH}(\text{CH})_2$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 24.1 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 23.2 (TrizCH_2); **HRMS (ES, positive mode) m/z :** calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{53}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ 813.3798; Found 813.3810 (1.44 ppm).

EXPERIMENTAL

Mono (4-(2-(5-(4-(4-ammonioethyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium-1-yl)-2-(4-phenethylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)piperidin-1-ium) **di**(2,2,2-trifluoroacetate) **mono**(trifluoromethanesulfonate) (**3.8**)

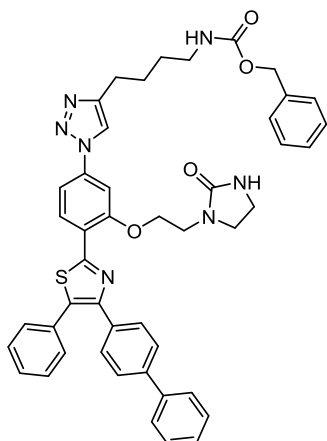


A solution of (**3.8**) (80 mg, 0.08 mmol) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) and in the presence of Pd/C 10% (16 mg) and TFA (0.6 mL) was subjected of hydrogenation with hydrogen balloon at room temperature overnight. After filtration (PTFE membrane filters), the reaction mixture was evaporated and subsequently co-evaporated with mixtures of CH₂Cl₂/MeOH (5 x 10 mL). The final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to yield 26 mg (34%) of (**3.8**) as a yellow oil. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 9.36 (s, 1H, Ar), 8.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.84 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.72 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.35 - 7.07 (m, 6H, Ar), 4.48 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, OCH₂), 4.40 (s, 3H, CH₃), 3.41 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H, CHH'(NH₂⁺)CHH'), 3.25 - 2.89 (m, 10H, CH₂CH₂Ph, CHH'(NH₂⁺)CHH', CH₂NH₃⁺, TrizCH₂), 2.20 - 1.71 (m, 9H, CH, OCH₂CH₂, CHH'(CH)CHH', CH₂CH₂NH₃⁺, TrizCH₂CH₂), 1.59 - 1.49 (m, 2H, CHH'(CH)CHH'); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 160.0 (OC_{Ar}), 157.8 (C_{Ar}), 157.6 (C_{Ar}), 146.5 (C_{Ar}), 146.4 (C_{Ar}), 142.7 (C_{Ar}), 131.0 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.0 (C_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 117.7 (CH_{Ar}), 114.5 (CH_{Ar}), 107.0 (CH_{Ar}), 68.7 (OCH₂), 45.3 (CH₂(NH₂⁺)CH₂), 40.1 (CH₂NH₃⁺), 38.4 (CH₃), 36.7 (CH₂CH₂Ph), 36.1 (OCH₂CH₂), 34.3 (CH₂CH₂Ph), 32.2 (CH), 29.8 (CH₂(CH)CH₂), 27.9 (CH₂CH₂NH₃⁺), 24.7 (TrizCH₂CH₂), 23.8 (TrizCH₂); HPLC (*Gradient A, Agilent*): t_r = 6.1 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₃₁H₄₁N₆O₈S₂ 545.3063; Found 545.3067 (0.85 ppm); Elemental analysis: calculated for C₃₆H₄₃F₉N₆O₈S₂: C. 46.85; H. 4.70; N. 9.11; S. 6.95; Found: C. 46.53; H. 4.69; N. 8.69; S. 6.69.

- General procedure for Hantzsch thiazole synthesis of disubstituted and symmetric analogues (Chapter - 3)**

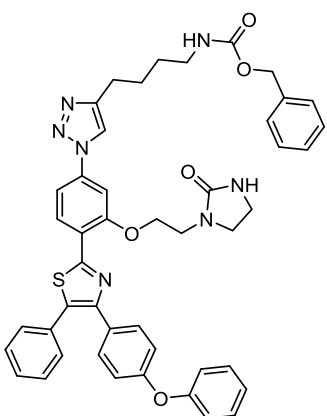
A solution of the corresponding thioamide (1 - 2.5 eq) in ⁱPrOH was treated with the appropriated α -bromoketone precursors (1 eq). The reaction mixture was stirred at 70 °C for 3 - 6 h in a pressure flask. Then, it was allowed to cool to room temperature and it was concentrated to dryness. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (eluent are specified in each case).

Benzyl (4-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (3.24)



Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with the thioamide (**2.13**) (194 mg, 0.36 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**3.17**) (127 mg, 0.36 mmol) in i PrOH (20 mL) was reacted. After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to afford 244 mg (84%) of (**3.24**) as a colourless oil. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.66 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.60 (s, 1H, Ar), 7.71 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.65 - 7.51 (m, 3H, Ar), 7.56 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.52 - 7.18 (m, 14H, Ar), 5.13 (br s, 1H, NHCON), 5.10 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.67 (br s, 1H, NHCbz), 4.47 (t, J = 5.9 Hz, 2H, OCH_2), 3.78 (t, J = 5.9 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.59 (dd, J = 9.0, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.37 - 3.22 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$, CH_2NHCbz), 2.84 (t, J = 7.3 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.86 - 1.74 (m, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.64 (quin, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 158.4 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.0 (NHCOO), 149.0 (C_{Ar}), 148.8 (C_{Ar}), 140.8 (C_{Ar}), 140.5 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 134.1 (CH_{Ar}), 132.3 (C_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.5 (C_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 119.2 (C_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.7 (NHCOOCH_2), 66.8 (OCH_2), 46.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.9 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCbz), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 26.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.2 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{46}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 789.3097; Found 789.3063 (-4.31 ppm).

Benzyl (4-(1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-phenyloxyphenyl-1-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (3.25)



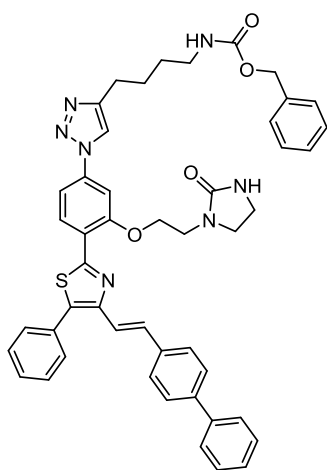
Following the general synthetic procedure of Hantzsch cyclization, the thioamide (**2.13**) (190 mg, 0.35 mmol) and the previously synthesized α -bromoketone (**3.18**) (130 mg, 0.35 mmol) in i PrOH (20 mL) were reacted. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to provide 235 mg (81%) of a colourless oil identified as (**3.25**). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8.63 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.90 (s, 1H, Ar), 7.65 - 7.55 (m, 3H, Ar), 7.47 - 7.24 (m, 13H, Ar), 7.11 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.04 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar), 6.95 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Ar), 5.14 (br s, 1H, NHCON), 5.09 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.73 (br s, 1H, NHCbz), 4.46 (t, J = 5.9 Hz, 2H, OCH_2), 3.77 (t, J = 5.9 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.59 (dd, J = 9.0, 6.7

EXPERIMENTAL

Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.37 - 3.21 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$, CH_2NHCbz), 2.84 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.84 - 1.74 (m, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.63 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ (ppm): 162.7 (NHCON), 158.3 (OC_{Ar}), 157.2 (C_{Ar}), 157.0 (OC_{Ar}), 156.6 (OC_{Ar}), 156.0 (NHCOO), 148.8 (C_{Ar}), 138.5 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 133.7 (C_{Ar}), 132.3 (C_{Ar}), 130.7 (CH_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Ar}), 122.5 (C_{Ar}), 119.3 (CH_{Ar}), 119.1 (C_{Ar}), 118.6 (CH_{Ar}), 112.5 (CH_{Ar}), 104.5 (CH_{Ar}), 67.7 (NHCOO CH_2), 66.8 (OCH_2), 46.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.9 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCbz), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 29.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 26.3 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 25.2 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{46}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ 805.3046; Found 805.3054 (0.92 ppm).

Benzyl

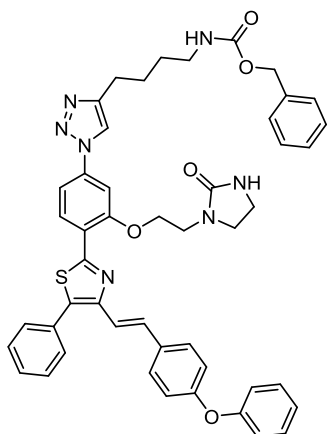
(*E*)-(4-(1-(4-(4-(2-([1,1'-biphenyl]-4-yl)vinyl)-5-phenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (**3.26**)



Following the general Hantzsch cyclization procedure, the thioamide (**2.13**) (200 mg, 0.37 mmol) was treated with the previously synthesized α -bromoketone (**3.22**) (140 mg, 0.37 mmol) in i PrOH (20 mL). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5) to obtain 183 mg (59%) of (**3.26**) as a yellow oil. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 8.72 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, Ar), 7.80 - 7.71 (m, 3H, Ar, ThiazCH=CH), 7.70 - 7.53 (m, 10H, Ar), 7.51 - 7.42 (m, 3H, Ar), 7.39 - 7.27 (m, 3H, Ar, NHCbz), 7.24 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, ThiazCH=CH), 6.42 (br s, 1H, NHCON), 5.02 (s, 2H, NHCOO CH_2), 4.48 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2), 3.66 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H,

OCH_2CH_2), 3.49 (dd, $J = 9.0$, 6.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.23 (dd, $J = 9.0$, 6.7 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.08 (q, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2NHCbz), 2.72 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.70 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.52 (quin, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 161.8 (NHCON), 158.0 (OC_{Ar}), 155.8 (NHCOO), 147.9 (C_{Ar}), 146.6 (C_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}), 139.3 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 137.1 (C_{Ar}), 135.8 (C_{Ar}), 135.0 (C_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 130.9 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.9 (CH_{Ar}), 126.7 (C_{Ar}), 126.2 (CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 119.9 (CH_{Ar}), 119.5 (C_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.3 (NHCOO CH_2), 64.9 (OCH_2), 45.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.3 (OCH_2CH_2), 39.9 (CH_2NHCbz), 37.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 28.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 25.8 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 24.5 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 815.3254; Found 815.3266 (1.56 ppm).

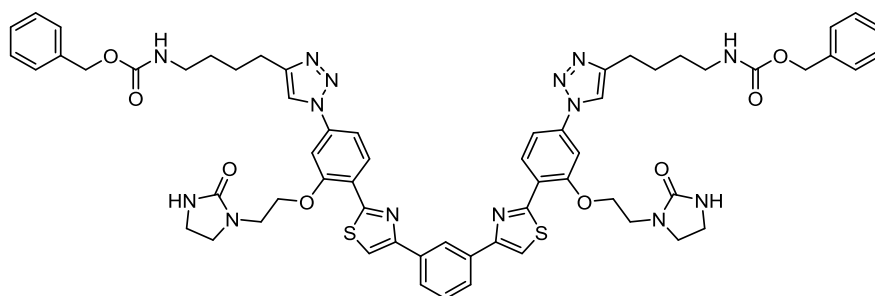
Benzyl **(E)-4-(1-(4-(4-(2-([4-phenyloxyphenyl]-1-yl)vinyl)-5-phenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (3.27)**



According to the general procedure of Hantzsch synthesis, the thioamide **(2.13)** (183 mg, 0.34 mmol) was reacted with the previously synthesized α -bromoketone **(3.23)** (134 mg, 0.34 mmol) in i PrOH (23 mL). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 96:4) to yield 150 mg (52%) of a colourless oil identified as **(3.27)**. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 8.74 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, J = 8.5 Hz, 1H, Ar), 7.85 - 7.67 (m, 3H, Ar, ThiazCH=CH), 7.64 - 7.51 (m, 5H, Ar), 7.51 - 7.24 (m, 9H, Ar), 7.20 - 7.10 (m, 2H, Ar, ThiazCH=CH), 7.05 (d, J = 7.7 Hz, 2H, Ar), 7.00 (d, J = 8.6 Hz, 2H, Ar), 6.40 (br s, 1H, NHCON),

5.01 (s, 2H, NHCOOCH_2), 4.49 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2), 3.66 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.49 (dd, J = 9.0, 6.6 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.22 (t, J = 7.9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.07 (q, J = 6.6 Hz, 2H, CH_2NHCBz), 2.74 (t, J = 7.5 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.69 (quin, J = 7.5 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.53 (quin, J = 7.2 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 158.1 (C_{Ar}), 156.6 (OC_{Ar}), 156.3 (OC_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 156.0 (NHCOO), 148.1 (C_{Ar}), 146.7 (OC_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 134.8 (C_{Ar}), 132.0 (C_{Ar}), 131.6 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 123.7 (CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 120.3 (C_{Ar}), 118.9 (CH_{Ar}), 118.7 (CH_{Ar}), 112.0 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.4 (NHCOOCH_2), 65.1 (OCH_2), 45.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2), 40.0 (CH_2NHCBz), 37.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 28.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 26.0 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 24.7 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ 831.3203; Found 831.3174 (-3.45 ppm).

Dibenzyl **(((1,3-phenylenebis(thiazole-4,2-diyl))bis(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4,1-phenylene))bis(1H-1,2,3-triazole-1,4-diyl))bis(butane-4,1-diyl))dicarbamate (3.44)**



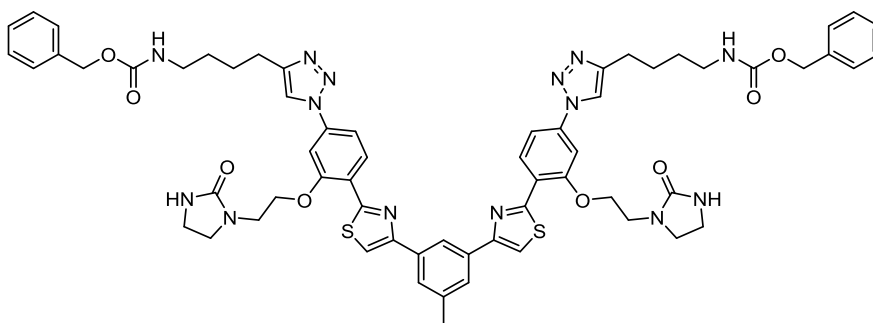
Following the general procedure of Hantzsch synthesis, the thioamide **(2.13)** (100 mg, 0.19 mmol) was reacted with the previously synthesized α -bromoketone **(3.36)** (30 mg, 0.09

EXPERIMENTAL

mmol) in ⁱPrOH (15 mL). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4) to afford 68 mg (30%) of **(3.44)** as a pink oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.75 (s, 2H, Ar), 8.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar), 8.37 (s, 2H, Ar), 8.12 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 2H, Ar), 7.79 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, Ar), 7.75 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 2H, Ar), 7.60 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.46 - 7.10 (m, 12H, Ar, NHCbz), 6.42 (s, 2H, NHCON), 5.01 (s, 4H, NHCOOCH₂), 4.52 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, OCH₂), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, OCH₂CH₂), 3.53 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 3.07 (q, *J* = 6.5 Hz, 4H, CH₂NHCbz), 2.74 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, TrizCH₂), 1.70 (quin, *J* = 7.6 Hz, 4H, TrizCH₂CH₂), 1.52 (quin, *J* = 7.2 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 160.2 (C_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 155.9 (NHCOO), 153.3 (C_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 137.3 (CH_{Ar}), 134.7 (C_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 126.0 (C_{Ar}), 123.7 (C_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 116.4 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 65.1 (NHCOOCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 28.9 (CH₂CH₂NHCbz), 26.0 (TrizCH₂CH₂), 24.7 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₆₂H₆₄N₁₄O₈S₂ 1196.4473; Found 1196.4482 (0.72 ppm).

Dibenzyl (((((5-methyl-1,3-phenylene)bis(thiazole-4,2-diyl))bis(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4,1-phenylene))bis(1H-1,2,3-triazole-1,4-diyl))bis(butane-4,1-diyl))dicarbamate () and benzyl (4-(1-(4-(4-(3-acetyl-5-methylphenyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)butyl)carbamate (**(3.45)**).

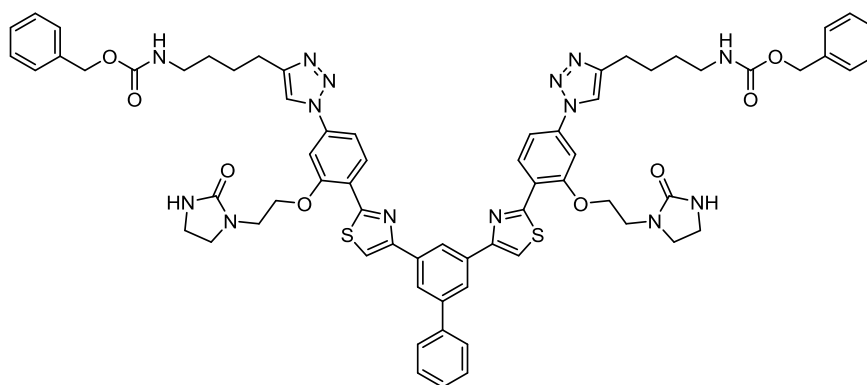
Following the general Hantzsch synthesis procedure, a pressure flask charged with thioamide (**(2.13)**) (175 mg, 0.33 mmol) and the previously synthesized α-bromoketone (**(3.37)**) (47 mg, 0.14 mmol) in ⁱPrOH (20 mL) was reacted. The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 96:4) to afford 84 mg (25%) of a pink oil identified as (**(3.45)**).



¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, 50 °C) δ (ppm): 8.70 (s, 2H, Ar), 8.67 (dd, *J* = 8.6, 1.1 Hz, 2H, Ar), 8.53 (s, 1H, Ar), 8.30 (d, *J* = 1.2 Hz, 2H, Ar), 7.95 (s, 2H, Ar), 7.79 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, Ar), 7.74 (dd, *J* = 8.9, 1.7 Hz, 2H, Ar), 7.44 - 7.24 (m, 12H, Ar), 7.15 (br s, 2H, NHCbz), 6.29 (s, 2H, NHCON), 5.02 (s, 4H, NHCOOCH₂), 4.54 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H, OCH₂), 3.69 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H, OCH₂CH₂), 3.53 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 (dd, *J* = 9.2, 6.5 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 3.08 (q, *J*

= 6.6 Hz, 4H, CH_2NHCbz), 2.76 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H, TrizCH_2), 1.72 (quin, $J = 7.6$ Hz, 4H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.54 (quin, $J = 7.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 160.1 (C_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 155.9 (NHCOO), 153.4 (C_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 138.6 (C_{Ar}), 138.3 (CH_{Ar}), 137.3 (CH_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 129.4 (C_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 116.3 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH_2), 65.1 (NHCOOCH_2), 45.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2), 37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 28.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$), 26.0 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 24.7 (TrizCH_2), 21.3 (CH_3); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{63}\text{H}_{66}\text{N}_{14}\text{O}_8\text{S}_2$ 1210.4630; Found 1210.4608 (-1.74 ppm).

Dibenzyl ((([1,1'-biphenyl]-3,5-diylbis(thiazole-4,2-diyl))bis(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4,1-phenylene))bis(1H-1,2,3-triazole-1,4-diyl))bis(butane-4,1-diyl))dicarbamate (3.46)

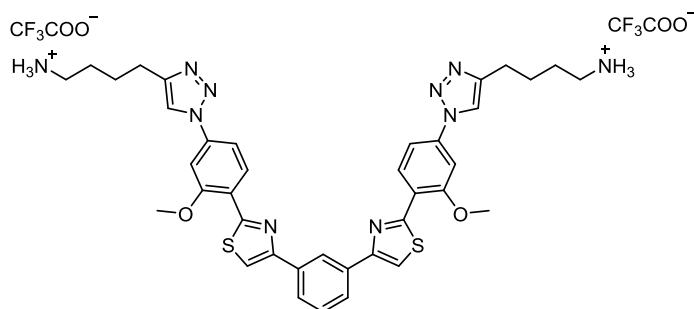


Following the general synthetic procedure of Hantzsch cyclization, the thioamide (**2.13**) (144 mg, 0.27 mmol) was treated with the previously synthesized α -bromoketone (**3.38**) (53 mg, 0.13 mmol) in i PrOH (20 mL). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 96:4) to give 65 mg (38%) of (**3.46**) as a pink oil. ^1H NMR (DMSO-d_6 , 400 MHz) δ (ppm): 8.76 (s, 2H, Ar), 8.71 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, Ar), 8.53 (d, $J = 0.9$ Hz, 2H, Ar), 8.37 (s, 2H, Ar), 7.95 (s, 1H, Ar), 7.90 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, Ar), 7.80 (s, 2H, Ar), 7.76 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ar), 7.58 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 7.45 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ar), 7.38 - 7.18 (m, 11H, Ar, NHCbz), 6.42 (s, 2H, NHCON), 5.01 (s, 4H, NHCOOCH_2), 4.54 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H, OCH_2), 3.70 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H, OCH_2CH_2), 3.53 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.25 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.06 (q, $J = 6.6$ Hz, 4H, CH_2NHCbz), 2.74 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, TrizCH_2), 1.70 (quin, $J = 7.5$ Hz, 4H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.51 (quin, $J = 7.2$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCbz}$); ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 160.3 (C_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 155.9 (NHCOO), 153.2 (C_{Ar}), 148.1 (C_{Ar}), 141.5 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 137.3 (CH_{Ar}), 135.4 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.3 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 124.3 (C_{Ar}), 123.0 (C_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 120.3 (CH_{Ar}), 116.9 (CH_{Ar}), 112.2 (CH_{Ar}), 104.4 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH_2), 65.1 (NHCOOCH_2), 45.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2),

EXPERIMENTAL

37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 28.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 26.0 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 24.7 (TrizCH_2); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for $\text{C}_{68}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_8\text{S}_2$ 1272.4786; Found 1272.4822 (2.83 ppm).

4,4'-(((1,3-phenylenebis(thiazole-4,2-diyl))bis(3-methoxy-4,1-phenylene))bis(1H-1,2,3-triazole-1,4-diyl))bis(butan-1-ammonium) bis(2,2,2 trifluoroacetate) (3.35)



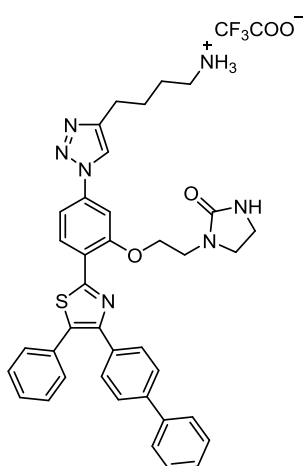
Following the general Hantzsch synthesis procedure, the thioamide (**3.43**) (46 mg, 0.11 mmol) was reacted with the previously synthesized (**3.36**) (18 mg, 0.06 mmol) in $^i\text{PrOH}$ (10 mL). After the work up, the final residue was purified by reverse phase semipreparative chromatography (From 0% of CH_3CN to 100% of CH_3CN) to afford 5 mg (9%) of the final deprotected compound (**3.35**) as a colourless oil. **^1H NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm)**: 8.81 (s, 2H, Ar), 8.75 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, Ar), 8.69 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ar), 8.43 (s, 2H, Ar), 8.15 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 2H, Ar), 7.79 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, Ar), 7.78 - 7.65 (m, 8H, Ar, NH_3^+), 7.63 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, Ar), 4.20 (s, 6H, OCH_3), 2.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, CH_2NH_3^+), 2.80 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H, TrizCH_2), 1.76 (quin, $J = 7.5$ Hz, 4H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.66 (quin, $J = 8.0$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$); **^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ (ppm)**: 162.1 (NHCON), 160.2 (OC_{Ar}), 158.0 (CF_3COO^-), 155.9 (C_{Ar}), 153.3 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 134.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 123.1 (C_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 120.5 (CH_{Ar}), 116.5 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH_2), 45.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.4 (OCH_2CH_2), 38.6 (CH_2NH_3^+), 37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 26.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 25.6 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 24.4 (TrizCH_2); **HPLC (Gradient A, Waters)**: $t_r = 6.5$ min; **MS (ESI, positive mode) m/z**: 733.3 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 367.1 [$\text{M}+2\text{H}$] $^{2+}$; **Elemental analysis**: calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{F}_6\text{N}_{10}\text{O}_6\text{S}_2$: C. 52.49; H. 4.41; N. 14.58; S. 6.67; Found: C. 52.39; H. 4.55; N. 15.05; S. 6.32.

- **General procedure for catalytic hydrogenation and/or hydrogenolysis of the Cbz group of disubstituted and/or symmetric compounds (Chapter - 3)**

A solution of the corresponding saturated or unsaturated Cbz protected compound (1 eq) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) containing Pd/C (10%) (20% wt/wt) (hydrogen balloon) was reacted at room temperature overnight in the presence of TFA (0.3 - 1.0 mL). The reaction mixture was filtered (PTFE membrane filters) and the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure and co-evaporated with mixtures of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (5 x 10 mL). The final

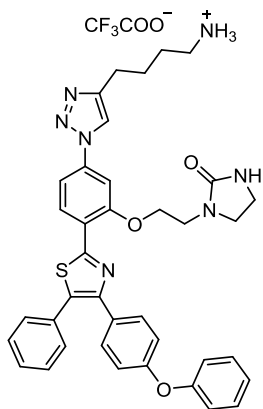
residues were purified on a SP1 Isolera Biotage HPFC system using reverse phase columns (From 0% of CH₃CN to 100% of CH₃CN in 45 min) to give the final deprotected compounds as trifluoroacetate salts.

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (3.9)



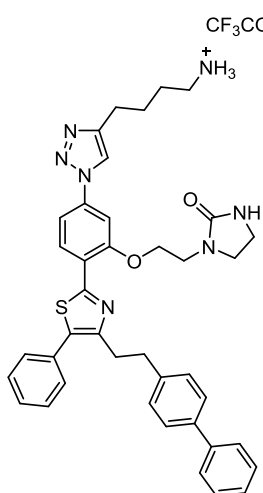
Following the general N-deprotection procedure, a solution of **(3.24)** (100 mg, 0.13 mmol), Pd/C 10 % (20 mg) and TFA (0.8 mL) in 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to obtain 15 mg (15%) of **(3.9)** as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.79 (s, 1H, Ar), 8.57 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 7.77 - 7.60 (m, 10H, Ar, NH₃⁺), 7.54 - 7.41 (m, 7H, Ar), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 6.40 (br s, 1H, NHCON), 4.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.66 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.51 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.76 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.63 (quin, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 157.9 (OC_{Ar}), 155.8 (C_{Ar}), 148.0 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 133.9 (C_{Ar}), 133.7 (C_{Ar}), 131.5 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 127.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 121.1 (CH_{Ar}), 120.4 (C_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.4 (OCH₂), 45.1 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.6 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.5 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 9.2 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₃₈H₃₇N₇O₂S 655.2729; Found 655.2748 (2.87 ppm); Elemental analysis: calculated for C₄₀H₃₈F₃N₇O₄S: C. 62.41; H. 4.98; N. 12.74; S. 4.16; Found: C. 62.36; H. 5.06; N. 12.37; S. 4.25.

1-(2-(5-(4-(4-Ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(4-([4-phenyloxyphenyl]-1-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (3.10)



Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(3.25)** (120 mg, 0.15 mmol) and Pd/C 10 % (24 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was subjected of hydrogenation in the presence of TFA (0.9 mL). The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by Biotage to provide 44 mg (37%) of **(3.10)** as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.78 (s, 1H, Ar), 8.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.83 - 7.72 (m, 3H, NH₃⁺), 7.71 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 7.50 - 7.32 (m, 7H, Ar), 7.17 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar), 6.98 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 6.39 (br s, 1H, NHCON), 4.51 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 3.65 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.50 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.91 - 2.80 (m, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.77 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.76 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.64 (quin, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 158.1 (CF₃COO⁻), 157.8 (C_{Ar}), 156.5 (OC_{Ar}), 156.2 (OC_{Ar}), 155.5 (OC_{Ar}), 147.9 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 133.3 (C_{Ar}), 131.5 (C_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 123.8 (CH_{Ar}), 121.1 (C_{Ar}), 120.4 (CH_{Ar}), 119.0 (CH_{Ar}), 118.1 (CH_{Ar}), 115.8 (CF₃COO⁻), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.3 (OCH₂), 45.1 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.6 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.5 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 9.7 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₃₈H₃₇N₇O₃S 671.2679; Found 671.2673 (-0.81 ppm); Elemental analysis: calculated for C₄₀H₃₈F₃N₇O₅S: C. 61.14; H. 4.87; N. 12.48; S. 4.08; Found: C. 61.55; H. 4.99; N. 12.12; S. 4.34.

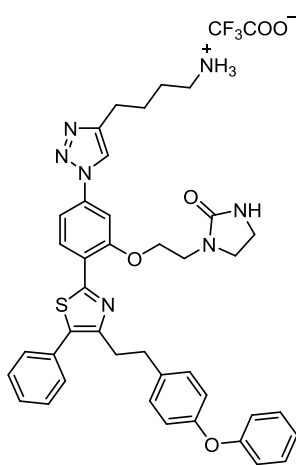
1-(2-(2-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)-5-phenylthiazol-2-yl)-5-(4-(4-ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (3.11)



Following the general hydrogenation procedure, a solution of **(3.26)** (91 mg, 0.11 mmol), and Pd/C 10 % (18 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (22 mL) was subjected of hydrogenation in the presence of TFA (0.7 mL). The final residue was purified by reverse phase on a Biotage to yield 14 mg (16%) of **(3.11)** as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.78 (s, 1H, Ar), 8.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.78 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.72 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, Ar), 7.73 - 7.65 (m, 3H, NH₃⁺), 7.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar), 7.54 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar), 7.49 - 7.38 (m, 7H, Ar), 7.33 (tt, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, Ar),

7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ar), 6.39 (br s, 1H, NHCON), 4.50 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, OCH₂), 3.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (dd, $J = 8.9, 6.7$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.21 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.16 - 3.12 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.85 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, TrizCH₂), 1.76 (quin, $J = 7.6$ Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.63 (quin, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 157.4 (C_{Ar}), 155.6 (OC_{Ar}), 150.1 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 140.1 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 133.4 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 121.3 (C_{Ar}), 120.4 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.4 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.7 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.6 (ThiazCH₂CH₂), 31.2 (ThiazCH₂CH₂), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.6 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): $t_r = 9.8$ min; HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for C₄₀H₄₁N₇O₂S 683.3042; Found 683.3050 (1.06 ppm); Elemental analysis: calculated for C₄₂H₄₂F₃N₇O₄S: C. 63.22; H. 5.31; N. 12.29; S. 4.02; Found: C. 63.40; H. 5.64; N. 12.50; S. 3.93.

1-(2-(2-(4-(2-([4-Phenyloxyphenyl]-1-yl)ethyl)-5-phenylthiazol-2-yl)-5-(4-(4-ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenoxy)ethyl)imidazolidin-2-one 2,2,2 trifluoroacetate (3.12)

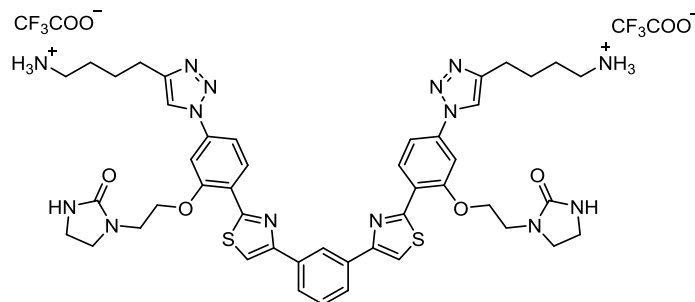


Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(3.27)** (80 mg, 0.10 mmol), Pd/C 10 % (16 mg) and TFA (0.6 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was hydrogenated. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by HPFC on a Biotage (From 0% of CH₃CN to 100% of CH₃CN) to afford 20 mg (26%) of **(3.12)** as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.78 (s, 1H, Ar), 8.56 - 8.50 (m, 1H, Ar), 7.77 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar), 7.81 - 7.64 (m, 4H, Ar, NH₃⁺), 7.62 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, Ar), 7.54 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Ar), 7.50 - 7.31 (m, 7H, Ar), 7.26 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Ar), 7.16 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 7.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, Ar), 6.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Ar), 6.90 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 6.39 (br s, 1H, NHCON), 4.49 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH₂), 3.64 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.48 (dd, $J = 9.0, 6.6$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.21 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.15 - 3.06 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.85 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, TrizCH₂), 1.75 (quin, $J = 7.4$ Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.64 (quin, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 157.3 (C_{Ar}), 157.1 (C_{Ar}), 155.6 (OC_{Ar}), 154.6 (C_{Ar}), 150.0 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 140.7 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 136.6 (C_{Ar}), 133.4 (C_{Ar}), 131.4 (CH_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 123.1 (CH_{Ar}), 121.3 (C_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 118.1 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.4 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.7 (CH₂NH₃⁺), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.6 (CH₂CH₂PhOPh), 31.2 (CH₂CH₂PhOPh), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.6 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂); HPLC (Gradient A, Agilent): $t_r = 9.7$ min;

EXPERIMENTAL

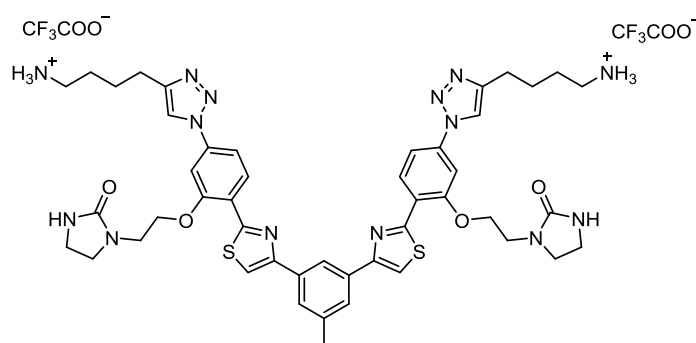
HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for $C_{40}H_{41}N_7O_3S$ 699.2992; Found 699.2993 (0.17 ppm); **Elemental analysis:** calculated for $C_{42}H_{42}F_3N_7O_5S$: C. 61.98; H. 5.20; N. 12.05; S. 3.94; Found: C. 62.23; H. 5.34; N. 11.68; S. 3.50.

1,1'-((((1,3-Phenylenebis(thiazole-4,2-diyl))bis(5-(4-(4-ammonibutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,1-phenylene))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(imidazolidin-2-one) bis(2,2,2-trifluoroacetate) (3.32)



Following the general Cbz removal procedure, a solution of **(3.44)** (120 mg, 0.11 mmol) and Pd/C 10 % (24 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (30 mL) was hydrogenated in the presence of TFA (1.0 mL). The final residue was purified by reverse HPFC on a Biotage to provide 22 mg (19%) of a colourless oil identified as **(3.32)**. **1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm):** 8.81 (s, 2H, Ar), 8.75 (s, 1H, Ar), 8.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar), 8.40 (s, 2H, Ar), 8.13 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 2H, Ar), 7.94 - 7.67 (m, 10H, Ar, NH_3^+), 7.62 (t, J = 7.7 Hz, 1H, Ar), 6.42 (br s, 2H, NHCON), 4.54 (t, J = 5.7 Hz, 4H, OCH_2), 3.69 (t, J = 5.6 Hz, 4H, OCH_2CH_2), 3.53 (dd, J = 8.9, 6.7 Hz, 4H, CH_2CH_2NHCON), 3.25 (t, J = 7.9 Hz, 4H, CH_2CH_2NHCON), 2.90 - 2.80 (m, 4H, $CH_2NH_3^+$), 2.78 (t, J = 7.3 Hz, 4H, $TrizCH_2$), 1.76 (quin, J = 7.4 Hz, 4H, $TrizCH_2CH_2$), 1.64 (quin, J = 7.7 Hz, 4H, $CH_2CH_2NH_3^+$); **^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ (ppm):** 162.1 (NHCON), 160.2 (OC_{Ar}), 158.0 (CF_3COO^-), 155.9 (C_{Ar}), 153.3 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 134.7 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 123.1 (C_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 120.5 (CH_{Ar}), 116.5 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH_2), 45.3 (CH_2CH_2NHCON), 42.4 (OCH_2CH_2), 38.6 ($CH_2NH_3^+$), 37.6 (CH_2CH_2NHCON), 26.5 ($CH_2CH_2NH_3^+$), 25.6 ($TrizCH_2CH_2$), 24.4 ($TrizCH_2$); **HPLC (Gradient A, Agilent):** t_r = 6.4 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for $C_{46}H_{52}N_{14}O_4S_2$ 928.3737; Found 928.3740 (0.27 ppm); **Elemental analysis:** calculated for $C_{50}H_{54}F_6N_{14}O_8S_2$: C. 51.90; H. 4.70; N. 16.95; S. 5.54; Found: C. 51.38; H. 5.16; N. 16.98; S. 5.83.

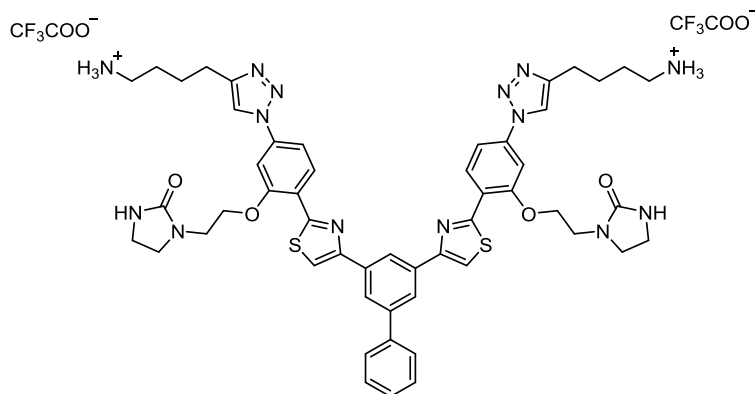
1,1'-((((5-Methyl-1,3-phenylene)bis(thiazole-4,2-diyl))bis(5-(4-(4-ammonioethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,1-phenylene))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(imidazolidin-2-one) bis(2,2,2-trifluoroacetate) (3.33)



Following the general Cbz deprotection procedure, a solution of **(3.45)** (75 mg, 0.06 mmol) and Pd/C 10 % (15 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was subjected of hydrogenation in the presence of TFA (0.5 mL). The final residue was purified by Biotage to give 11 mg (15%) of **(3.33)** as a colourless oil. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 8.81 (s, 2H, Ar), 8.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar), 8.54 (s, 1H, Ar), 8.37 (s, 2H, Ar), 7.97 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H, Ar), 7.81 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, Ar), 7.76 (d, *J* = 8.6, 1.8 Hz, 2H, Ar), 7.78 - 7.67 (m, 6H, NH₃⁺), 6.43 (br s, 2H, NHCON), 4.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, OCH₂), 3.69 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, OCH₂CH₂), 3.53 (dd, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 3.25 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 2.85 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, CH₂NH₃⁺), 2.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H, TrizCH₂), 2.55 (s, 3H, CH₃), 1.75 (quin, *J* = 7.5 Hz, 4H, TrizCH₂CH₂), 1.64 (quin, *J* = 7.9 Hz, 4H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.2 (NHCON), 160.1 (OC_{Ar}), 158.0 (CF₃COO⁻), 155.9 (C_{Ar}), 153.4 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 138.6 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 121.2 (CH_{Ar}), 121.1 (C_{Ar}), 120.5 (CH_{Ar}), 116.3 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.7 (CH₂NH₃⁺), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.6 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂), 21.3 (CH₃); HPLC (Gradient A, Agilent): t_r = 6.7 min; HRMS (ES, positive mode) m/z: calculated for C₄₇H₅₄N₁₄O₄S₂ 942.3894; Found 942.3848 (-4.85 ppm); Elemental analysis: calculated for C₅₁H₅₆F₆N₁₄O₈S₂: C. 52.30; H. 4.82; N. 16.74; S. 5.47; Found: C. 52.55; H. 4.97; N. 16.98; S. 5.23.

EXPERIMENTAL

1,1'-((((1,1'-Biphenyl]-3,5-diylbis(thiazole-4,2-diyl))bis(5-(4-(4-ammoniobutyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,1-phenylene))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(imidazolidin-2-one) bis(2,2,2-trifluoroacetate) (3.34)



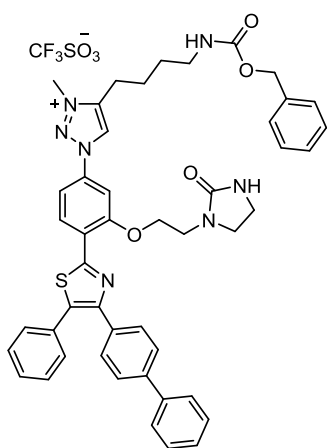
According to the general synthetic procedure of Cbz removal, a solution of **(3.46)** (80 mg, 0.06 mmol), Pd/C 10 % (16 mg) and TFA (0.6 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (20 mL) was subjected of hydrogenation. The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to provide 4 mg (6%) of **(3.34)** as a colourless oil.

¹H NMR (DMSO-d₆, 500 MHz, 60 °C) δ (ppm): 8.73 (t, *J* = 1.6 Hz, 1 H, Ar), 8.73 (s, 2H, Ar), 8.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar), 8.47 (s, 2H, Ar), 8.36 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, Ar), 7.89 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H, Ar), 7.80 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H, Ar), 7.74 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 2H, Ar), 7.66 (br s, 6H, NH₃⁺), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.48 (dt, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, Ar), 6.25 (br s, 2H, NHCON), 4.56 (t, *J* = 5.8 Hz, 4H, OCH₂), 3.70 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H, OCH₂CH₂), 3.55 (dd, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 3.27 (dd, *J* = 9.2, 6.7 Hz, 4H, CH₂CH₂NHCON), 2.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, CH₂NH₃⁺), 2.80 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H, TrizCH₂), 1.79 (quin, *J* = 7.3 Hz, 4H, TrizCH₂CH₂), 1.68 (quin, *J* = 7.8 Hz, 4H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 125 MHz) δ (ppm):** 162.2 (NHCON), 160.3 (OC_{Ar}), 155.9 (C_{Ar}), 153.2 (C_{Ar}), 147.7 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 135.4 (CH_{Ar}), 134.2 (C_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 124.3 (C_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 120.5 (CH_{Ar}), 112.1 (CH_{Ar}), 104.3 (CH_{Ar}), 67.6 (OCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.4 (OCH₂CH₂), 38.7 (CH₂NH₃⁺), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 26.5 (CH₂CH₂NH₃⁺), 25.6 (TrizCH₂CH₂), 24.4 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** t_r = 7.5 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for C₅₂H₅₆N₁₄O₄S₂ 1004.4061; Found 1004.4050 (1.07 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₅₆H₅₈F₆N₁₄O₈S₂: C. 54.54; H. 4.74; N. 15.90; S. 5.20; Found: C. 55.01; H. 4.77; N. 15.63; S. 5.66.

• General procedure of triazole alkylation (Chapter - 3)

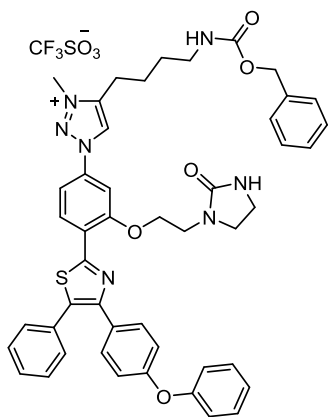
To a solution of the corresponding triazole (1 eq) in dry CH_2Cl_2 , methyl trifluoromethanesulfonate (1-2 eq) was added and the mixture was stirred at room temperature for 15 min under argon atmosphere. Then, the reaction was quenched with MeOH (10 mL) and H_2O (5 mL) and subsequently evaporated to dryness. The residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (eluents are specified in each case).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium, trifluoromethanesulfonate (3.28)



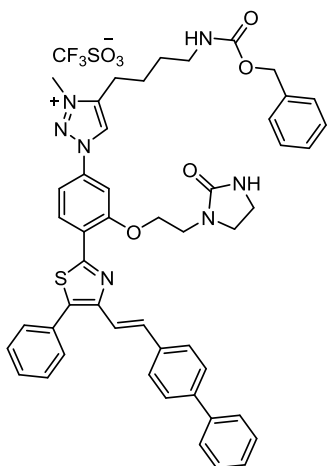
Following the general procedure of alkylation, a solution of the triazole **(3.24)** (134 mg, 0.17 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (19 μL , 0.19 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 96:4) to yield 106 mg (66%) of **(3.28)** as a yellow oil. $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 9.17 (s, 1H, Ar), 8.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 7.72 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, Ar), 7.67 - 7.51 (m, 7H, Ar), 7.46 - 7.20 (m, 13H, Ar), 5.07 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.46 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2), 4.27 (CH_3), 3.71 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.55 (dd, $J = 9.3, 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.26 - 3.19 (m, 2H, CH_2NHCBz), 2.90 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, TrizCH_2), 1.83 (quin, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.68 (quin, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm): 164.9 (NHCON), 159.0 (OC_{Ar}), 158.8 (C_{Ar}), 157.3 (NHCOO), 150.0 (C_{Ar}), 146.9 (C_{Ar}), 141.7 (C_{Ar}), 141.4 (C_{Ar}), 138.4 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 136.7 (C_{Ar}), 135.1 (C_{Ar}), 133.1 (CH_{Ar}), 130.7 (CH_{Ar}), 130.6 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 129.6 (C_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.3 (CH_{Ar}), 126.2 (C_{Ar}), 114.7 (CH_{Ar}), 106.8 (CH_{Ar}), 68.3 (NHCOOCH_2), 67.4 (OCH_2), 46.7 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 43.7 (OCH_2CH_2), 40.9 (CH_2NHCBz), 39.2 (CH_3), 38.4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 30.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 24.8 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 23.8 (TrizCH_2); **HRMS** (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_7\text{O}_4\text{S}$ 804.3332; Found 804.3338 (0.79 ppm).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-([4-phenyloxyphenyl]-1-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium, trifluoromethanesulfonate (3.29)



Following the general alkylation procedure, a solution of the triazole (**3.25**) (150 mg, 0.19 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (21 μL , 0.19 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 96:4) to afford 131 mg (73%) of a yellow oil characterized as (**3.29**). ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 9.22 (s, 1H, Ar), 8.64 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.79 (d, J = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.67 (dd, J = 8.6, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 2H, Ar), 7.45 - 7.22 (m, 12H, Ar), 7.13 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.01 (d, J = 7.8 Hz, 2H, Ar), 6.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar), 5.07 (s, 2H, NCOOCH_2), 4.51 (t, J = 5.7 Hz, 2H, OCH_2), 4.33 (s, 3H, CH_3), 3.73 (t, J = 5.6 Hz, 2H, OCH_2CH_2), 3.58 (dd, J = 9.3, 6.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.35 (dd, J = 9.3, 6.8 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 3.24 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2NHCBz), 2.98 (t, J = 7.8 Hz, 2H, TrizCH_2), 1.87 (quin, J = 7.9 Hz, 2H, $\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 1.71 (quin, J = 7.0 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 156.9 (OC_{Ar}), 156.6 (C_{Ar}), 156.2 (OC_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 155.6 (NHCOO), 148.3 (C_{Ar}), 145.1 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 134.3 (C_{Ar}), 131.2 (C_{Ar}), 130.4 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 123.8 (C_{Ar}), 119.0 (CH_{Ar}), 118.2 (C_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 67.8 (NHCOOCH_2), 65.2 (OCH_2), 45.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 42.3 (OCH_2CH_2), 37.9 (CH_3), 37.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCON}$), 28.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCBz}$), 23.4 ($\text{TrizCH}_2\text{CH}_2$), 22.3 (TrizCH_2); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for $\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_7\text{O}_5\text{S}$ 820.3281; Found 820.3301 (2.39 ppm).

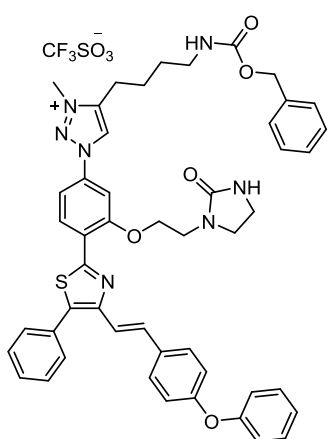
1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)vinyl)thiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-(((benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium trifluoromethanesulfonate (3.30)



According to the general procedure of alkylation, a solution of triazole (**3.26**) (102 mg, 0.13 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (15 mL) was treated with methyl trifluoromethanesulfonate (14 μL , 0.13 mmol). After the work up, the final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 92:8) to obtain 101 mg (82%) of (**3.30**) as a yellow oil. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm): 9.56 (s, 1H, Ar), 8.78 (d, J = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.94 (d, J = 2.5 Hz, 1H, Ar), 7.85 - 7.76 (m, 2H, Ar, ThiazCH=CH), 7.73 - 7.64 (m, 7H, Ar),

7.60 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, Ar), 7.54 - 7.45 (m, 3H, Ar), 7.40 - 7.24 (m, 8H, Ar, ThiazCH=CH, NHCbz), 6.42 (br s, 1H, NHCON), 5.03 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.54 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH₂), 4.37 (CH₃), 3.69 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.51 (dd, $J = 9.0, 6.7$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.12 (q, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.96 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, TrizCH₂), 1.79 (quin, $J = 7.7$ Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.61 (quin, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 157.3 (C_{Ar}), 156.2 (OC_{Ar}), 155.9 (NHCOO), 147.0 (C_{Ar}), 145.1 (C_{Ar}), 139.7 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 136.2 (C_{Ar}), 136.1 (C_{Ar}), 135.8 (C_{Ar}), 132.1 (C_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.4 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.6 (C_{Ar}), 127.4 (CH_{Ar}), 127.1 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 123.7 (CH_{Ar}), 119.5 (CH_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.2 (CH_{Ar}), 67.9 (NHCOOCH₂), 65.2 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 37.9 (CH₃), 37.6 (CH₂CH₂NHCON), 28.6 (CH₂CH₂NHCbz), 23.5 (TrizCH₂CH₂), 22.3 (TrizCH₂); HRMS (ES, positive mode) m/z : calculated for C₄₉H₄₈N₇O₄S 830.3488; Found 830.3461 (-3.26 ppm).

4-(4-(((Benzyloxy)carbonyl)amino)butyl)-3-methyl-1-(3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)-4-(4-(2-([4-phenyloxyphenyl]-1-yl)vinyl)-5-phenylthiazol-2-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-3-ium, trifluoromethanesulfonate (3.31)



Following the general alkylation procedure, a solution of triazole (3.27) (57 mg, 0.07 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) was reacted with methyl trifluoromethanesulfonate (8 μ L, 0.07 mmol). The final residue was purified by CCTLC in the Chromatotron (CH₂Cl₂/MeOH, 94:6) to yield 54 mg (79%) of a yellow oil identified as (3.31). ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm): 9.55 (s, 1H, Ar), 8.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Ar), 7.94 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ar), 7.82 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H, Ar), 7.75 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H, ThiazCH=CH), 7.67 - 7.54 (m, 5H, Ar), 7.53 - 7.47 (m, 1H, Ar), 7.43 - 7.38 (m, 7H, Ar, NHCbz), 7.21 - 7.13 (m, 2H, Ar,

ThiazCH=CH), 7.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, Ar), 7.02 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCON), 5.02 (s, 2H, NHCOOCH₂), 4.54 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH₂), 4.36 (s, 3H, CH₃), 3.69 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.50 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.24 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.12 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH₂NHCbz), 2.96 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, TrizCH₂), 1.79 (quin, $J = 7.1$ Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.61 (quin, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH₂CH₂NHCbz); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 157.3 (C_{Ar}), 156.7 (OC_{Ar}), 156.3 (OC_{Ar}), 156.2 (OC_{Ar}), 155.8 (NHCOO), 147.1 (C_{Ar}), 145.1 (OC_{Ar}), 137.2 (C_{Ar}), 136.1 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 131.9 (CH_{Ar}), 130.8 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.4 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 127.8 (CH_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 123.8 (CH_{Ar}), 118.9 (CH_{Ar}), 118.7 (CH_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.2 (CH_{Ar}), 67.9 (NHCOOCH₂), 65.1 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 38.5 (CH₂NHCbz), 37.9 (CH₃), 37.6

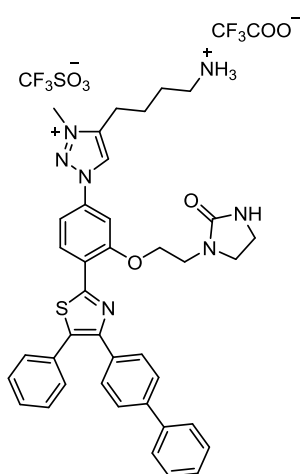
EXPERIMENTAL

(CH₂CH₂NHCON), 28.5 (CH₂CH₂NHCbz), 23.5 (TrizCH₂CH₂), 22.3 (TrizCH₂); **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated for C₄₉H₄₈N₇O₅S 846.3438; Found 846.3399 (-4.53 ppm).

- **General procedure of catalytic hydrogenation and/or hydrogenolysis of Cbz group of disubstituted triazole salts (Chapter - 3)**

A solution of the corresponding saturated or unsaturated Cbz protected triazole salts (1 eq) in a 1:1 mixture of THF/MeOH containing Pd/C (10%) (20% wt/wt) was hydrogenated (hydrogen balloon) at room temperature overnight in the presence of TFA (0.5 - 1.0 mL). The reaction mixture was filtered (PTFE membrane filters) and the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure and co-evaporated with mixtures of CH₂Cl₂/MeOH (5 x 10 mL). The final residues were purified on a SP1 Isolera Biotage instrument using reverse phase columns (From 0% of CH₃CN to 100% of CH₃CN in 30 min) to give compounds (colorless oils) in yields specified as trifluoroacetate salts.

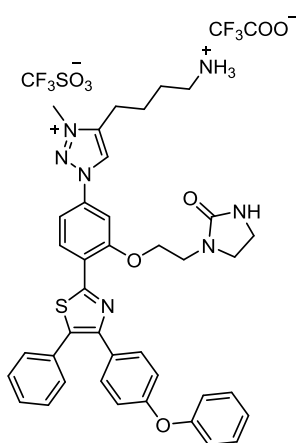
4-(4-Ammoniobutyl)-1-(4-(4-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (3.13)



Following the general Cbz hydrogenolysis procedure, a solution of **(3.28)** (95 mg, 0.10 mmol) and Pd/C 10 % (19 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL), was subjected of hydrogenation in the presence of TFA (0.8 mL). The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to yield 43 mg (47%) of **(3.13)** as a yellow oil. **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm)**: 9.63 (s, 1H, Ar), 8.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.97 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 8.00 - 7.87 (m, 3H, NH₃⁺), 7.81 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.77 - 7.56 (m, 6H, Ar), 7.54 - 7.40 (m, 7H, Ar), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 6.42 (br s, 1H, NHCON), 4.56 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.38 (s, 3H, CH₃), 3.68 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.51 (dd, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 2.95 - 2.86 (m, 2H, CH₂NH₃⁺), 1.86 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.74 (quin, *J* = 8.1 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ (ppm)**: 162.1 (NHCON), 158.0 (CF₃COO⁻), 157.1 (OC_{Ar}), 155.7 (C_{Ar}), 148.4 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 139.3 (C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 135.0 (C_{Ar}), 133.5 (C_{Ar}), 131.2 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.7 (CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 120.4 (C_{Ar}), 118.8 (CF₃SO₃⁻), 115.8 (CF₃COO⁻), 113.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 38.2 (CH₂NH₃⁺), 38.0 (CH₂CH₂NHCON), 37.6 (CH₃), 26.1 (CH₂CH₂NH₃⁺), 22.9 (TrizCH₂CH₂), 22.0 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Waters)**: *t_r* = 7.2 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z**: calculated

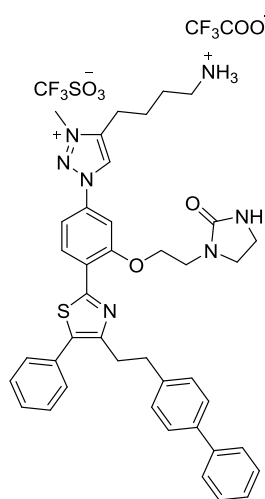
for $C_{39}H_{40}N_7O_2S$ 670.2964; Found 670.2949 (-2.23 ppm); **Elemental analysis:** calculated for $C_{42}H_{41}F_6N_7O_7S_2$: C. 54.01; H. 4.43; N. 10.50; S. 6.87; Found: C. 54.34; H. 4.71; N. 10.55; S. 6.88.

4-(4-Ammoniobutyl)-1-(4-(4-([4-phenyloxyphenyl]-1-yl)-5-phenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-3-methyl-1H-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (3.14)



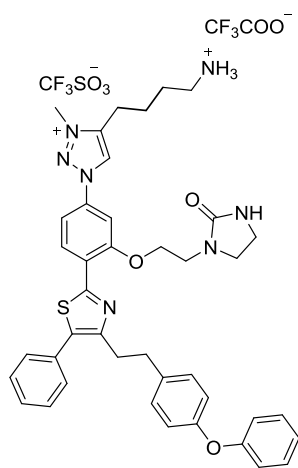
Following the general procedure of N-deprotection, a solution of **(3.29)** (98 mg, 0.10 mmol) and Pd/C 10 % (20 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was subjected of hydrogenation in the presence of TFA (0.9 mL). The final residue was purified by Biotage to provide 37 mg (38%) of **(3.14)** as a yellow oil. **¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm):** 9.61 (s, 1H, Ar), 8.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 7.96 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar), 7.91 - 7.85 (m, 3H, NH₃⁺), 7.80 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 7.50 - 7.33 (m, 7H, Ar), 7.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.07 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar), 7.00 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCON), 4.55 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂), 4.38 (s, 3H, CH₃), 3.68 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.50 (dd, *J* = 9.0, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.23 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 2.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 2.92 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 1.85 (quin, *J* = 7.6 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.74 (quin, *J* = 7.8 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz) δ (ppm):** 162.1 (NHCON), 158.3 (CF₃COO⁻), 156.9 (C_{Ar}), 156.7 (OC_{Ar}), 156.1 (OC_{Ar}), 155.7 (OC_{Ar}), 148.3 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 135.9 (C_{Ar}), 134.3 (C_{Ar}), 131.2 (C_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 129.2 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 128.6 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 123.8 (CH_{Ar}), 119.0 (CH_{Ar}), 118.2 (C_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 38.3 (CH₂NH₃⁺), 38.0 (CH₂CH₂NHCON), 37.6 (CH₃), 26.1 (CH₂CH₂NH₃⁺), 22.9 (TrizCH₂CH₂), 22.0 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Waters):** t_r = 7.3 min; **HRMS (ES, positive mode) m/z:** calculated for $C_{39}H_{40}N_7O_3S$ 686.2913; Found 686.2914 (0.16 ppm); **Elemental analysis:** calculated for $C_{42}H_{41}F_6N_7O_8S_2$: C. 53.10; H. 4.35; N. 10.32; S. 6.75; Found: C. 53.75; H. 4.23; N. 9.72; S. 6.95.

1-(4-(4-(2-([1,1'-Biphenyl]-4-yl)ethyl)-5-phenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-ammoniobutyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (3.15)



Following the general hydrogenation procedure, a solution of **(3.30)** (95 mg, 0.10 mmol) and Pd/C 10 % (19 mg) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (25 mL) was hydrogenated in the presence of TFA (0.9 mL). The reaction mixture was worked up and the final residue was purified by reverse phase HPFC on a Biotage to yield 24 mg (26%) of a yellow oil identified as **(3.15)**. **¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm):** 9.59 (s, 1H, Ar), 8.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.93 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar), 7.79 (dd, *J* = 8.6, 1.9 Hz, 1H, Ar), 7.83 - 7.72 (m, 3H, NH₃⁺), 7.62 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.50 - 7.38 (m, 7H, Ar), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCON), 4.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.38 (CH₃), 3.67 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (dd, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.17 - 3.14 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.83 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.72 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); **¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm):** 162.1 (NHCON), 156.4 (C_{Ar}), 155.5 (OC_{Ar}), 150.5 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 140.6 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 137.9 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 134.5 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.2 (CH_{Ar}), 126.6 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 124.1 (C_{Ar}), 122.8 (CH_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 67.8 (OCH₂), 45.2 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 38.3 (CH₂NH₃⁺), 38.0 (CH₃), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.6 (ThiazCH₂CH₂), 31.1 (ThiazCH₂CH₂), 26.2 (CH₂CH₂NH₃⁺), 22.9 (TrizCH₂CH₂), 22.0 (TrizCH₂); **HPLC (Gradient A, Agilent):** *t_r* = 8.5 min; **HRMS (ES, positive mode) *m/z*:** calculated for C₄₁H₄₄N₇O₂S 698.3277; Found 698.3283 (0.88 ppm); **Elemental analysis:** calculated for C₄₄H₄₅F₆N₇O₇S₂: C. 54.94; H. 5.72; N. 10.19; S. 6.67; Found: C. 54.50; H. 5.57; N. 9.56; S. 6.35.

1-(4-(4-(2-([4-phenyloxyphenyl]-1-yl)ethyl)-5-phenylthiazol-2-yl)-3-(2-(2-oxoimidazolidin-1-yl)ethoxy)phenyl)-4-(4-ammoniobutyl)-3-methyl-1*H*-1,2,3-triazol-3-ium 2,2,2-trifluoroacetate trifluoromethanesulfonate (3.16)



Following the general procedure Cbz hydrogenolysis, a solution of **(3.31)** (40 mg, 0.04 mmol), Pd/C 10 % (8 mg) and TFA (0.4 mL) in a 1:1 mixture of THF/MeOH (18 mL) was subjected of hydrogenation. The final residue was purified by Biotage to afford 6 mg (15%) of **(3.16)** as a yellow oil. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ (ppm): 9.59 (s, 1H, Ar), 8.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar), 7.93 (d, *J* = 2H, Ar), 7.55 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.50 - 7.38 (m, 7H, Ar), 7.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar), 6.41 (br s, 1H, NHCON), 4.53 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, OCH₂), 4.38 (CH₃), 3.67 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, OCH₂CH₂), 3.49 (dd, *J* = 8.9, 6.7 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂CH₂NHCON), 3.17 - 3.14 (m, 4H, ThiazCH₂CH₂), 2.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂NH₃⁺), 2.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂), 1.83 (quin, *J* = 7.5 Hz, 2H, TrizCH₂CH₂), 1.72 (quin, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₃⁺); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ (ppm): 162.1 (NHCON), 157.0 (OC_{Ar}), 156.4 (C_{Ar}), 155.5 (OC_{Ar}), 154.6 (OC_{Ar}), 150.5 (C_{Ar}), 144.8 (C_{Ar}), 136.5 (C_{Ar}), 135.7 (C_{Ar}), 134.6 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.8 (CH_{Ar}), 129.1 (CH_{Ar}), 129.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 126.5 (CH_{Ar}), 124.1 (C_{Ar}), 123.1 (CH_{Ar}), 118.8 (CH_{Ar}), 118.1 (CH_{Ar}), 113.5 (CH_{Ar}), 106.1 (CH_{Ar}), 67.9 (OCH₂), 45.3 (CH₂CH₂NHCON), 42.3 (OCH₂CH₂), 38.3 (CH₂NH₃⁺), 38.0 (CH₃), 37.5 (CH₂CH₂NHCON), 34.3 (ThiazCH₂CH₂), 31.2 (ThiazCH₂CH₂), 26.2 (CH₂CH₂NH₃⁺), 23.0 (TrizCH₂CH₂), 22.0 (TrizCH₂); HPLC (G_{c1}): *t*_r = 6.5 min; HRMS (ES, positive mode) *m/z*: calculated for C₄₁H₄₄N₇O₃S 714.3226; Found 714.3218 (-1.23 ppm); Elemental analysis: calculated for C₄₄H₄₅F₆N₇O₈S₂: C. 54.04; H. 4.64; N. 10.03; S. 6.56; Found: C. 54.15; H. 4.78; N. 10.11; S. 6.73.

E2. SOLUBILITY AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES CHARACTERIZATION

E2.1. Solubility measurements

Water-solubility values were determined by HPLC analysis. The HPLC runs were carried out on a Waters 484 System using Novapack C18 reverse phase column. Flow rate: 1 mL/min. Detection: UV 254 nm. Gradient solvent system A/B (CH₃CN/water): initial 10% A + 90% B; 10 min linear gradient to 100% B; Excess amount of the compounds was suspended in deionized water (pH = 5.5), sonicated for 10 min at room temperature, and then equilibrated overnight at room temperature. The samples were centrifuged at 14.000 rpm in a *Hettich* eppendorf microcentrifuge for 15 min at room temperature. 160 µL of the clear supernatant (S1) were transferred to a vial and diluted to a concentration within the range of a five-point standard curve (S2). Concentration of the 5 standard calibrators was 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM and 500 µM respectively and the percentage of DMSO in all these solutions was 5% (v/v) ensuring that the final solvent content of all standards and samples remains consistent. 5% is also the maximum percentage of DMSO present in the biological assays. Water-solubility was finally calculated comparing the HPLC peak area of the sample (S2) with the standards whose concentration was known.

E2.1.1. Absorption measurements.

UV-Vis absorption spectra were recorded with a Varian Cary 3-Bio spectrophotometer. Molar extinction coefficient (ϵ [$M^{-1} cm^{-1}$]), defined for a specific compound in a specific solvent, wavelength and temperature, was calculated from a serie of 4-5 absorbance measurements with different compound concentration from a stock solution of the compound in CH₃CN 1×10^{-4} M approximately. This parameter was obtained measuring the absorbance value in the absorption maximum wavelength (from 0 to 1) and applying the Beer-Lambert law ($\epsilon = A \times l \times c$) where “A” was the absorption value in the maximum wavelength, “l” was the cuvette width (1 cm) and “c” was the concentration of compound in the cuvette.

E2.2. Emission measurements.

Fluorescence emission measurements were carried out on a Cary Eclipse (Varian) spectrophotometer with a pre-heated xenon flash lamp using a delay for detection of 30 µs with respect to the lamp pulse. Excitation wavelength (λ_{ex}) and emission wavelength (λ_{em}) were specified for each compound. Data analysis was performed with OriginPro 8 software²⁷.

E2.2.1. Fluorescence spectra.

In a quartz fluorescence cuvette, a solution of compound in CH₃CN was pre-adjusted to an absorbance value of 0.1 a.u in order to not saturate the fluorescence spectrophotometer detector. Then, the excitation wavelength (λ_{ex}) was fixed in the maximum absorption

wavelength and the spectra were recorded from 5 nm after the maximum absorption wavelength to the double value of the starting wavelength. Quantum yield (ϕ) was calculated measuring the area under the curve of the fluorescence spectra of a specific compound compared to an standard fluorescence spectra measured the same day, excited at the same wavelength and whose emission maximum wavelength was close the compound one. In our case, standard was quinine sulfate (QS) 0.1 N in sulfuric acid.

$$\phi = \phi_s \times \frac{Int \frac{1 - 10^{-A_s}}{n_s^2}}{Int_s \frac{1 - 10^{-A}}{n^2}}$$

Quantum yield equation. ϕ_s is the standard quantum yield, Int is the area under the curve of the fluorescence spectra. A is the absorbance in the absorption maximum wavelength and n is the refraction index of the solvent.

E2.2.2. Excitation spectra.

In a quartz fluorescence cuvette, a solution of compound in CH₃CN was pre-adjusted to an absorbance value of 0.1 a.u in order to not saturate the fluorescence spectrophotometer detector. Experiment was carried out after the fluorescence spectra acquisition fixing the emission wavelength (λ_{em}) close to maximum and recording the emission values at different excitation wavelength (λ_{ex}).

E3. COMPUTATIONAL METHODS

E3.1. FTMap software and CAVER software

- Prediction of putative binding sites was performed by FTMap free computational mapping server^{28,29}. Starting from the target protein submitted to the software through its PDB ID code (2JK6 in this case), a large variety of different nature simple solvents were docked and energetically minimized as probes to map the macromolecule surface. Regions that bind several clusters of multiple probe types identify the binding hot spots. Results were downloaded from the application in pdb format and analyzed with PyMOL taking into account the clustering (base on the score of solvent poses and graphically represented by the main solvent of the cluster) and visual analysis. The 16 different solvents used as probes were: ethanol, isopropanol, isobutanol, acetone, acetaldehyde, dimethyl ether, cyclohexane, ethane, CH₃CN, urea, methylamine, phenol, benzaldehyde, benzene, acetamide, and N,N dimethylformamide. These solvents cover a large range of size, shape and polarity so they were representative of the chemical space of possible ligand interactions across the protein surface.

EXPERIMENTAL

- Simultaneously, the access of a ligand to a predicted cavity was evaluated by using CAVER (version 1.0) software, a free tool for analysis of tunnels and channels in biomolecules^{30,31}. Protein structure was submitted to the web portal through its PDB ID code (2JK6). Results included information about the presence of putative tunnels or channels described by physic parameters as bottleneck radius (the narrowest diameter across the pathway) [Å], length [Å] and curvature. All these parameters were used to score the possible solutions and to cluster them. Results were also visually analyzed in PyMOL to suggest putative pathways from the solvent-exposed protein surface to a buried cavity in the enzyme core.

E3.2. Docking studies

3D structures of ligands were generated through conversion from their 2D structures to mol format using ChemSketch³² (ACD/Labs 2016 2.2). Subsequently, mol format was converted into pdb format using PyMOL³³ molecular visualization system (version 1.3, Schrödinger) and then, Gasteiger partial charges were added by using AutoDock Tools³⁴ (version 1.5.6, Scripps Research Institute). Final optimized compounds **(I)** - **(J)** were used as ligands for the automated docking experiments using the crystallized structure of the enzyme TryR in its reduced form (2JK6 code)³⁵, determined by X-Ray in complex with NADPH and FAD and deposited in the data base Protein Data Bank (PDB)³⁶. Lamarckian genetic algorithm implemented in AutoDock 4.2^{37,38} was used to generate the docked conformations within the putative binding cavity on the dimer's interface by randomly changing the overall orientation of the molecule as well as the torsion angles and all rotatable bonds. Default settings were used except for the number of runs, population size and maximum number of energy evaluations, which were fixed at 250, 100 and 250 000 respectively. Rapid intra- and intermolecular energy evaluations of each configuration was achieved by having the atomic affinity of the receptor for aliphatic and aromatic carbon, oxygen, nitrogen, and hydrogen atoms pre-calculated in a three-dimensional grid of 60x60x60 Å with a spacing of 0.375 Å and centered on the dimer's interface cavity. A distance-dependent dielectric function was used in the computation of electrostatic interactions. Ligand poses were clustered according to its scoring function (kcal mol⁻¹) and subsequently selected attending to energetic and visual analysis criteria.

E3.3. Molecular dynamic simulations (MD simulations)

MD simulations were carried out employing the *pmemd.cuda* unit of AMBER 14³⁹ suite of programs and using ff14SB force field. Limited periodic scanning was performed and the electrostatic interactions were treated by using the Particle mesh Ewald method (PME) with a network spacing of 1 Å. *Cutoff* distance for the non-binding interactions was 10 Å for the ligand-protein complexes. A SHAKE algorithm was applied to all possible hydrogen bonds in an integration time of 2.0 fs. This way, firstly solvent molecules and counter-ions were

energetically minimized and homogeneously distributed along a positionally restricted solute ($25 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) for 25 ps of molecular dynamic at constant temperature and pressure (300 K, 1 atm respectively). Then, these starting restrictions were gradually removed until their disappearance in progressive energetic minimizations. Resulting systems were heated again from 100 to 300 K for 20 ps and equilibrated in five cycles of 1 ns of molecular dynamic. Finally, simulations of 100 ns were carried out at 300 K and 1 atm where the coordinate systems were recorded every 2 ps for subsequent analysis. MD simulations were performed in a NVIDIA GeForce GTX780 GPU.

E4. BIOLOGICAL EVALUATION

E4.1. *Li*-TryR and hGR oxidoreductase activity assay

Oxidoreductase activity was determined according to the method described by Hamilton et al.⁴⁰. Briefly, reactions were carried out at 26 °C (250 μL) of HEPES pH 8.0 (40 mM) buffer containing EDTA (1 mM), NADPH (150 μM), NADP^+ (30 μM), DTNB (25 μM), T[S]_2 (1 μM), glycerol (0.02%), DMSO (1.5%) and recombinant *Li*-TryR or hGR (7 nM). For IC_{50} determinations, enzyme was pre-incubated with the compounds (concentrations ranging from 75 μM to 0.29 μM) for 10 min prior the addition of T[S]_2 and NADPH. Enzyme activity was monitored by the increase in absorbance at 412 nm for 1 h at 26 °C in a *VERSAmax* microplate reader (Molecular Devices, California, USA). All assays were conducted in triplicate in at least three independent experiments. Data were analyzed using a non-linear regression model with the Grafit6 software⁴¹ (Erithacus, Horley, Surrey, UK).

E4.2. Dimer quantitation assay

Stability of the *Li*-TryR or hGR dimeric form in the presence of the compounds was evaluated using an Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) implemented by Prof Antonio Jimenez's laboratory⁴². Briefly a dual (HIS/FLAG) tagged enzyme (400 nM) was incubated in a dimerization buffer (200 μL 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0) for 16 h at 37 °C under stirring and in a humid atmosphere in the presence of different compound concentration (10 to 90 μM) in 1.5ml tubes. Next, tubes were centrifuged at 30.000 rpm and supernatants were disposed in anti-flag coated 96 well plates and incubated 30 min, at 37 °C with gentle shaking. Then the plates were washed ten times with TTBS (Tween 0.1%, 2 mM Tris, 138 mM, NaCl 138 pH 7.6) and incubated with diluted monoclonal α -HIS HRP conjugated antibody (200 μL , Abcam, Cambridge, UK) in BSA (5%) in TTBS for 1 h at room temperature. The plates were washed once again as previously described and 1,2-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) substrate (100 μL , Dako, Glostrup, Denmark) prepared according to manufacturer's instructions was added. The enzymatic reaction was stopped after 10 min with H_2SO_4 (100 μL , 0.5 M) and the absorbances were measured at 490 nm in a *VERSAmax*

microplate reader (Molecular Devices, California, USA). All the assays were conducted in triplicate in at least three independent experiments. Data were analyzed using a non-linear regression model with the Grafit6 software (Erithacus, Horley, Surrey, UK).

E4.3. *In vitro* leishmanicidal activity assay

Three different phases can be distinguished in parasites screening:

- Phase 0: Promastigotes, amastigotes, monocytes (THP-1) and hepatocytes (HepG2) are treated with a compound solution of 25 μ M.
- Phase 1: If at 25 μ M, more than a 50% of a parasites or human cells population dead, a half-effective concentration (EC_{50}) evaluation was performed using 25 μ M as maximum concentration.
- Phase 2: If the selectivity index between human cells and amastigotes is up to 10, infection model were tested. In that case, monocytes were differentiated into macrophages with phorbol myristate acetate (PMA) and then infected with amastigotes species. Finally, infected macrophages were treated with different compound concentrations in order to obtain an EC_{50} value through flow cytometer.

E4.3.1. Estimation of EC_{50} values against promastigotes.

Firstly, p96 plates were spread with 200 μ L of a solution of promastigotes $2 \cdot 10^6$ parasites/mL. After treatment with 1 μ L of a specific solution 5 mM of compound in DMSO, final concentration of compound in the plate was 25 μ M (DMSO percentage was always equal or less than a 5% in the plate containing parasite forms). In order to obtain an EC_{50} value, different concentration solutions of compound dissolved in DMSO were tested starting from the highest concentration 25 μ M. Ultimately plates were sealed with *parafilm* and incubated for 24 h at 26 °C. Finally, 2 μ L of a propidium iodide solution 1 mg/mL (10 μ g/mL in the plate) was added and plate was read by a flow cytometer.

E4.3.2. Estimation of EC_{50} values against amastigotes.

Firstly, p96 plates were spread with 200 μ L of a solution of amastigotes 10^6 parasites/mL. After treatment with 1 μ L of a specific solution 5 mM of compound in DMSO and suspending with a p200 pipette to ensure a good mixture, final concentration of compound in the plate was 25 μ M. Ultimately plates were sealed with *parafilm* and incubated for 24h at 37 °C. Finally, 2 μ L of a propidium iodide solution 1 mg/mL (10 μ g/mL in the plate) was added and plate was read by a flow cytometer.

E4.3.3. Estimation of CC₅₀ values against monocytes (THP-1) and hepatocytes (HepG2) and THP-1 differentiated monocytes.

- p96 plates were spread with 200 μ L of a solution of human cells (400.000 monocytes/mL). After treatment with 1 μ L of a specific solution 5 mM of compound in DMSO, plates were sealed with *parafilm* and incubated for 24h at 37 °C and a 5% of CO₂. After that time, 2 μ L of a propidium iodide solution 1 mg/mL (10 μ g/mL in the plate) was added and plate was read by a flow cytometer.
- HepG2 cells were seeded in p24 plates *Nunc* Delta Surface (10⁵ cells/mL) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Cells were treated with compound solutions at different concentrations, washed after 24h with PBS (three times) and incubated for 10 minutes in presence of a crystal violet solution (2%) and ethanol (2%). Subsequently, plates were twice immersed in water and dried. Once plates were dried, an aqueous solution of sodium dodecyl sulfate (SDS) (1% w/v) was added and the mixture was incubated under stirring (300 rpm) for 20 minutes. Finally absorbance was measured in *EnSpire* plate reader at 570 nm. CC₅₀ values were obtained comparing the sample absorbance against control without compound treatment.
- THP-1 monocytes were also differentiated to macrophages seeding 1.2 x 10⁵ cells/mL of the first and subsequently treated it with PMA (10 ng/mL) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium. The evaluation of the toxicity of our compounds against these cells was developed following the same procedure used for HepG2.

E4.3.4. Estimation of EC₅₀ values against infected macrophages.

Human THP-1 monocytic cells were seeded at 1.2 x 10⁵ cells/ml in 24-multidish plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and differentiated to macrophages for 24 h in 1 ml of RPMI 1640 medium containing 10 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Medium culture was removed, and 1.2 x 10⁶ *Leishmania* amastigotes in 1 ml of THP-1 medium were added to each well. Four hours later, the medium with non-infective amastigotes was completely removed, washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS), and replaced with new THP-1 medium and the corresponding treatment. After 48 h of treatment, medium was removed; THP-1 cells were washed 3 times with 1xPBS and detached with *TrypLE Express* (Invitrogen, Leiden, The Netherlands) according to the manufacturer's indications. Infection quantification was measured by flow cytometry. Drug concentrations ranged from 0.2 M to 25 M.

EXPERIMENTAL

E4.3.5. Evaluation of compound's influence on superoxide radical production.

L. infantum axenic promastigotes MCAN/ES/89/IPZ229/1/89 of logarithmic culture were seeded to a concentration of 2×10^6 parasites/mL in p96 plates of "U" form, sealed with *parafilm* and finally treated with different compound concentrations for 24h. Then, 1 μ M of the dihydroethidium (DHE) fluorescent probe from *Invitrogen* was added to mainly detect the intracellular superoxide radical. After incubation for 45 minutes, samples were measured by flow cytometry acquiring 10^4 events and analyzing the fluorescent intensity in live parasites of the reaction product 2-hydroxiethidium consequence of the reaction between the probe and the superoxide radical.

E4.3.6. Evaluation of compound's influence on parasite thiol levels

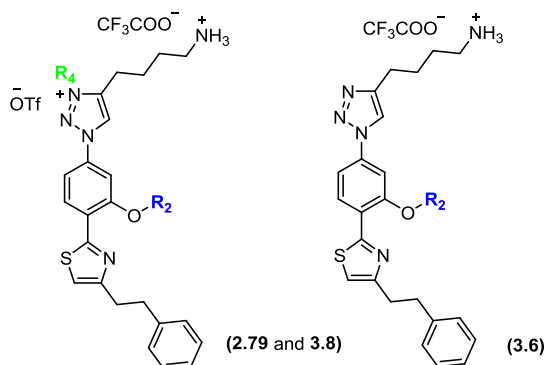
L. infantum axenic promastigotes MCAN/ES/89/IPZ229/1/89 of logarithmic culture were seeded to a concentration of 2×10^6 parasites/mL in p24 plates from *Nunclon Delta Surface*, sealed with *parafilm* and finally treated with a compound solution of 75 μ M for 1h. After 30 minutes, 100 nM of the fluorescent probe 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) from *Invitrogen*. After 1h of treatment, parasites were centrifuged and washed twice with PBS. Finally, fluorescence of samples was measured by flow cytometry acquiring 10^4 events and analyzing the fluorescent intensity emitted by CMF-thiols conjugates in live parasites.

E5. X-RAY CRISTALLOGRAPHY

Li-TryR sample used for crystallization was at 7.5 mg/ml in 20 mM Tris buffer pH 8. Native protein crystals were obtained by the hanging drop vapour diffusion method, mixing 1 μ l protein sample with 1 μ l well solution (0.1 M Tris-HCl pH 8, 2.2 M (NH₄)₂SO₄, 500 μ l reservoir volume). Yellow bi-pyramidal crystals grew up in two days and were then used for soaking experiments.

Li-TryR crystals were soaked in a solution with **(2.79, 3.6 or 3.8)** ligands (0.1 M Tris-HCl pH 8, 2.2 M (NH₄)₂SO₄) then cryoprotected in a modified reservoir solution containing 25 % glycerol. Ligand concentrations and incubation times were specified in **Table E.1**. Single wavelength ($\lambda=0.979$ Å) diffraction data was collected at beamline BL-13 (XALOC) of the ALBA Synchrotron (Barcelona, Spain) at 100K. XDS⁴³ program was used for indexing images and integration and AIMLESS from CCP4⁴⁴ software package for scaling and merging the data, reserving 5 % of the diffraction data for cross-validation. The structure was solved by the molecular replacement method with MOLREP⁴⁵ using *Li*-TryR (PDB ID: 2JK6) as the search model. Two monomers were found in the asymmetric unit that were then refined using REFMAC⁴⁶, employing tight geometric and noncrystallographic symmetry restraints, jelly-body refinement and map sharpening. Model building was carried out using the program COOT⁴⁷.

Table E.1. Experimental conditions for crystal formation in presence of ligands **(2.79, 3.6 or 3.8)**.



Compound	R ₂	R ₄	Ligand concentration (mM)	Incubation times	Space group ^a	Resolution cutoff ^b (Å)
2.79		Me	1	30-50 min	P41212	2.4
3.8		Me	1.5	30-40 min	P41212	3.0
3.6		/	1.5	overnight	P41212	2.7

^a Symmetry group of the configuration in the crystal; ^b Highest resolvable peak in the diffraction pattern.

E6.BIBLIOGRAPHY

- (1) Ngo, Q. A.; Nguyen, L. A.; Vo, N. B.; Nguyen, T. H.; Roussi, F.; Nguyen, T. H.; Nguyen, V. T. Synthesis and antiproliferative activity of new vinca alkaloids containing an α,β -unsaturated aromatic side chain. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (23), 5597–5600. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.10.040>.
- (2) Ayling, E. E.; Hodges, J.; Meredith, R. F. K. 528. Aryldihydroresorcinols. Part I. Dihydro-5- α -naphthyl- and 5-(4-diphenyl) dihydro-resorcinol. *J. Chem. Soc.* **1956**, 0 (0), 2679–2683. <https://doi.org/10.1039/JR9560002679>.
- (3) Challenger, S.; Cook, A. S.; Gillmore, A. T.; Middleton, D. S.; Pryde, D. C.; Stobie, A. PCT Int. Appl. WO 2002079143 A1 20021010, **2002**.
- (4) Noppen, S.; Sa, G.; Fernando, J. D.; Camarasa, M.J.; Liekens, S.; Priego, E. Novel colchicine-site binders with a cyclohexanedione scaffold identified through a ligand-based virtual screening approach. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (10), 3924–3938. <https://doi.org/10.1021/jm401939g>
- (5) Masaki, Y.; Sakuma, K.; Kaji, K. Facile synthesis of (*E*)-allylic alcohols by acid-catalyzed modification of the Mislow-Evans rearrangement of allylic sulfoxides. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33 (6), 2531–2534. <https://doi.org/10.1248/cpb.33.2531>.
- (6) Torii, S.; Tanaka, H.; Katoh, T. Reductive conversion of nitro alkenes to ketones and/or oximes in an aqueous HClO_4 – CH_2Cl_2 –dioxane–(Pb) system. *Chem. Lett.* **1983**, 12 (4), 607–610. <https://doi.org/10.1246/cl.1983.607>.
- (7) Hu, Y.; Shen, Y.; Wu, X.; Tu, X.; Wang, G. X. Synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives containing imidazole skeleton as potential antibacterial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 958–969. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.100>.
- (8) House, H. O.; Jones, V. K.; Frank, G. A. The chemistry of carbanions. VI. Stereochemistry of the Wittig reaction with stabilized ylids. *J. Org. Chem.* **1964**, 29 (11), 3327–3333. <https://doi.org/10.1021/jo01034a049>.
- (9) Hoffmann, C. S. K. G. K. PCT Int. Appl. WO2012139775A1, **2012**.
- (10) Ulrich, P.; Cerami, A. Trypanocidal 1,3-arylene diketone bis(guanylhydrazones). structure-activity relationships among substituted and heterocyclic analogues. *J. Med. Chem.* **1984**, 27 (1), 35–40. <https://doi.org/10.1021/jm00367a007>.
- (11) Hoffmann, I.; Blumenröder, B.; Onodi neé Thumann, S.; Dommer, S.; Schatz, J. Suzuki cross-coupling in aqueous media. *Green Chem.* **2015**, 17 (7), 3844–3857. <https://doi.org/10.1039/C5GC00794A>.
- (12) Zav'yalov, S. I.; Kravchenko, N. E. Effect of amides on the bromination of methyl alkyl ketones. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1984**, 33 (2), 418–420. <https://doi.org/10.1007/BF00951090>.
- (13) Fujii, S.; Hamakawa, T.; Ogawa, K.; Muranaka, Y.; Hashimoto, Appl. number: 06492873. **1981**.
- (14) Myrbäck, K. *Acta Chemica Scandinavica*. **1947**. 296-296. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.02-0296>
- (15) Jong, C. L.; Yong, H. B.; Chang, S. K. Efficient α -halogenation of carbonyl compounds by N-bromosuccinimide and N-chlorosuccinimide. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, 24 (4), 407–408. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2003.24.4.407>

- (16) Musso, L.; Cincinelli, R.; Zuco, V.; Zunino, F.; Nurisso, A.; Cuendet, M.; Giannini, G.; Vesci, L.; Pisano, C.; Dallavalle, S. Investigation on the ZBG-functionality of phenyl-4-yl-acrylohydroxamic acid derivatives as histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (20), 4457–4460. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.09.006>.
- (17) Koch, F.; Stolte, M.; Zitzler-Kunkel, A.; Bialas, D.; Steinbacher, A.; Brixner, T.; Würthner, F. Unraveling the structure and exciton coupling for multichromophoric merocyanine dye molecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19* (9), 6368–6378. <https://doi.org/10.1039/C7CP00115K>.
- (18) Bur, Daniel; Corminboeuf, Olivier; Cren, Sylvaine; Grisostomi, Corinna; Leroy, Xavier; Pozzi, Davide; Richard-Bildstein, S. PCT Int. Appl. WO 2011-IB55125, **2011**.
- (19) Papillon, S. C.-Y. H. PCT Int. Appl. PCT/EP2010/056572, **2010**.
- (20) Cummings, C. G.; Ross, N. T.; Katt, W. P.; Hamilton, A. D. Synthesis and biological evaluation of a 5-6-5 imidazole-phenyl-thiazole based α -helix mimetic. *Org. Lett.* **2009**, *11* (1), 25–28. <https://doi.org/10.1021/ol8022962>.
- (21) Lago, A. M. PCT Int. Appl. WO 2000-US2676, **2000**.
- (22) Suginome, M.; Tanaka, Y.; Hasui, T. Reductive amination of aldehydes using aminoboranes as iminium ion generators. *Synlett.* **2006**, *7*, 1047–1050. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939070>.
- (23) Cristau, H. J.; Cellier, P. P.; Spindler, J. F.; Taillefer, M. Highly Efficient and mild copper-catalyzed N- and C-arylations with aryl bromides and iodides. *Chem. - A Eur. J.* **2004**, *10* (22), 5607–5622. <https://doi.org/10.1002/chem.200400582>.
- (24) Brys, R. C. X.; Edwards, P.; Schmidt, W.; Andrews, M. J. I.; Chambers, M. S.; Clase, J. A.; Birault, V.; Hirst, K. L.; MacLeod, A.; Bar, G.; Harris, C. J.; Huxley, P. PCT Int. Appl. WO 2007-EP54654, **2007**.
- (25) Cummings, C. G.; Hamilton, A. D. Expedient route to functionalized a water soluble 5-6-5 imidazole-phenyl-thiazole based α -helix mimetics. *Tetrahedron* **2013**, *69* (5), 1663–1668. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.070>.
- (26) Özgeriş, B.; Aksu, K.; Tümer, F.; Göksu, S. Synthesis of Dopamine, Rotigotin, Ladostigil, Rasagiline analogues 2-amino-4,5,6-trimethoxyindane, 1-amino-5,6,7-trimethoxyindane, and their sulfamide derivatives. *Synth. Commun.* **2015**, *45* (1), 78–85. <https://doi.org/10.1080/00397911.2014.957321>.
- (27) OriginPro 8 <https://www.originlab.com/>.
- (28) Bohnuud, T.; Beglov, D.; Ngan, C. H.; Zerbe, B.; Hall, D. R.; Brenke, R.; Vajda, S.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Kozakov, D. Computational mapping reveals dramatic effect of hoogsteen breathing on duplex DNA reactivity with formaldehyde. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (16), 7644–7652. <https://doi.org/10.1093/nar/gks519>.
- (29) Kozakov, D.; Grove, L. E.; Hall, D. R.; Bohnuud, T.; Mottarella, S. E.; Luo, L.; Xia, B.; Beglov, D.; Vajda, S. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (5), 733–755. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.043>.
- (30) Petřek, M.; Otyepka, M.; Banáš, P.; Košinová, P.; Koča, J.; Damborský, J. CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-316>.

EXPERIMENTAL

- (31) Pavelka, A.; Sebestova, E.; Kozlikova, B.; Brezovsky, J.; Sochor, J.; Damborsky, J. CAVER: algorithms for analyzing dynamics of tunnels in macromolecules. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma.* **2016**, *13* (3), 505–517. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2459680>.
- (32) ChemSketch ACD/Structure Elucidator, version 15.01, Advanced chemistry development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, **2015**.
- (33) Pymol The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC.
- (34) Autodock Tools 1.5.6. <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>
- (35) Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (8), 2603–2612. <https://doi.org/10.1021/jm900185q>.
- (36) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, **2000**, *28* (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (37) Autodock 4.2 <http://autodock.scripps.edu/downloads/autodock-registration/autodock-4-2-download-page/>.
- (38) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (39) D.A. Case, I.Y.; Ben-Shalom, S.R.; Brozell, D.S.; Cerutti, T.E.; Cheatham, V.W.D.; Cruzeiro, T.A.; Darden, R.E.; Duke, D.; Ghoreishi, M.K.; Gilson, H.; Gohlke, A.W.; Goetz, D.; Greene, R.; Harris, N.; Homeyer, S.; Izadi, A.; Kovalenko, T.; Kurtzman, T.S.; Lee, S.; LeGrand, P.; Li, C.; Lin, J.; Liu, T.; Luchko, R.; Luo, D.J.; Mermelstein, K.M.; Merz, Y.; Miao, G.; Monard, C.; Nguyen, H.; Nguyen, I.; Omelyan, A.; Onufriev, F.; Pan, R.; Qi, D.R.; Roe, A.; Roitberg, C.; Sagui, S.; Schott-Verdugo, J.; Shen, C.L.; Simmerling, J.; Smith, R.; Salomon-Ferrer, J.; Swails, R.C.; Walker, J.; Wang, H.; Wei, R.M.; Wolf, X.; Wu, L.; Xiao, D.M.; York and P.A. Kollman. **2018**, AMBER 2018, University of California, San Francisco.
- (40) Hamilton, C. J.; Saravanamuthu, A.; Eggleston, I. M.; Fairlamb, A. H. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione *in situ*: Substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem. J.* **2003**, *369* (3), 529–537. <https://doi.org/10.1042/bj20021298>.
- (41) Grafit6 Leatherbarrow, R.J. (**2009**) GraFit Version 6, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K.
- (42) Toro, M. A.; Sánchez-Murcia, P. A.; Moreno, D.; Ruiz-Santaquiteria, M.; Alzate, J. F.; Negri, A.; Camarasa, M. J.; Gago, F.; Velázquez, S.; Jiménez-Ruiz, A. Probing the dimerization interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with site-directed mutagenesis and short peptides. *ChemBioChem*. **2013**, *14* (10), 1212–1217. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200744>.
- (43) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.

-
- (44) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>.
- (45) Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: An automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30* (6), 1022–1025. <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>.
- (46) Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 355–367. <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>.
- (47) Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.

